

**Nichtwässrige Kapillarelektrophorese  
zur Analytik von Peptiden**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Arndt Psurek  
geboren am 31. März 1976 in Gera

#### Gutachter

1. Prof. Dr. G. K. E. Scriba, Jena
2. Prof. Dr. J. Lehmann, Jena
3. Prof. Dr. G. Blaschke, Münster

Tag der Doktorprüfung: 28. November 2005

Tag der öffentlichen Verteidigung: 8. Dezember 2005

*Für Katharina und meine Kinder Amelie und Konrad*

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2001 bis Oktober 2005 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Scriba angefertigt. Bei ihm möchte ich mich besonders für die interessante Aufgabenstellung, sein großes Engagement zur Schaffung guter Arbeitsbedingungen und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann und Herrn Prof. Dr. Gottfried Blaschke danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei allen Kollegen des Lehrstuhls für Pharmazeutische/Medizinische Chemie möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonders danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die angenehme Zeit in einer freundschaftlichen Atmosphäre. Im Einzelnen sind dies Silvia de Boni und Martina Hense, mit denen ich das Labor teilen durfte, sowie Falko Süß, Manuela Hammitzsch und Uwe Conrad, deren Unterstützung ich mir stets gewiss sein konnte.

Herrn PD Dr. Frank-Michael Matysik und den Mitgliedern seines Arbeitskreises am Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig, gilt mein Dank für die Einführung in die CE-ED-Thematik und die Hilfe bei der Durchführung der NACE-ED-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Hans Brückner und Herrn Dr. Thomas Degenkolb, Institut für Ernährungswissenschaften, Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ), Universität Gießen, danke ich für die Bereitstellung der Alamethicin F30-Probe und die produktive Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Christian Neusüß und Herrn Dr. Matthias Pelzing, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, danke ich für die äußerst wichtige Unterstützung und die angenehme Atmosphäre bei der Durchführung der NACE-MS-Messungen. Bei Herrn Dr. Christian Neusüß möchte ich mich ganz besonders für die Hilfe bei der Interpretation der MS-Daten bedanken.

Frau Dr. Diana Imhof, Institut für Biochemie, Universität Jena, danke ich für die Hilfe bei der Peptid-Festphasensynthese.

Bei Frau Sophie Feuerstein und Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold, Institut für Physikalische Biologie im Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, möchte ich mich für Auswertung der CD-Spektren bedanken.

Friedemann Gaube, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie des Instituts für Pharmazie in Jena, und Grit Fröhlich danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Meiner Lebensgefährtin Katharina und meinen Kindern Amelie und Konrad danke ich ganz besonders für das Verständnis, das sie vor allem in der Schlussphase für mich aufgebracht haben.

Ferner gilt mein Dank auch allen, die, ohne namentlich genannt zu sein, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung und Ziel der Arbeit.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Teil.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Grundlagen der Kapillarelektrophorese.....</i>	3
2.1.1 Elektromigration der Analyte.....	3
2.1.2 Elektroosmose.....	5
2.2 <i>Detektion.....</i>	7
2.2.1 Optische Detektionsverfahren.....	7
2.2.2 Elektrochemische Detektionsverfahren.....	8
2.2.3 Massenspektrometrische Detektion.....	10
2.3 <i>Kapillarelektrophorese von Peptiden.....</i>	16
2.3.1 Sequenzierung von Peptiden mit ESI-MS.....	18
2.3.2 Elektrochemische Detektion von Peptiden.....	20
2.4 <i>Bestimmung physikochemischer Parameter.....</i>	21
2.4.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	21
2.5 <i>Verwendung nichtwässriger Lösungsmittel in der Kapillarelektrophorese.....</i>	24
2.5.1 Anforderungen an nichtwässrige Lösungsmittel.....	24
2.5.2 pH-Wert im nichtwässrigen Milieu.....	26
2.5.3 Selektivität.....	27
2.5.4 Detektion in der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese.....	28
<b>3 Übersicht zu den Manuskripten.....</b>	<b>30</b>
<b>4 Manuskripte.....</b>	<b>33</b>
4.1 <i>Manuskript 1.....</i>	33
Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: Comparison of methanol and aqueous buffers	
A. Psurek, G. K. E. Scriba, <i>Electrophoresis</i> 2003, 24, 765-773.	

4.2	<i>Manuskript 2</i> .....	43
	Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of $\alpha$ -helical polypeptides - effect of secondary structure on separation selectivity	
	A. Psurek, S. Feuerstein, D. Willbold, G. K. E. Scriba, <i>Electrophoresis</i> , in Überarbeitung (Datum der Aufforderung zur Überarbeitung: 04.10.2005).	
4.3	<i>Manuskript 3</i> .....	58
	Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry	
	A. Psurek, C. Neusüß, E. Balaguer, D. Imhof, T. Degenkolb, H. Brückner, G. K. E. Scriba, <i>Journal of Peptide Science</i> , im Druck (Datum der Annahmebestätigung: 25.07.2005).	
4.4	<i>Manuskript 4</i> .....	71
	Analysis of the lipophilic peptaibol alamethicin by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry	
	A. Psurek, C. Neusüß, M. Pelzing, G. K. E. Scriba, <i>Electrophoresis</i> 2005, 26, 4368-4378.	
4.5	<i>Manuskript 5</i> .....	83
	Determination of enkephalin peptides by non-aqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection	
	A. Psurek, F.-M. Matysik, G.K.E. Scriba, <i>Electrophoresis</i> , zur Publikation angenommen (Datum der Annahmebestätigung: 31.08.2005).	
<b>5</b>	<b>Gesamtdiskussion</b> .....	<b>100</b>
5.1	<i>Effekte des Lösungsmittels auf das Dissoziationsverhalten von Peptiden</i> .....	100
5.1.1	pK <sub>a</sub> -Wert-Bestimmung.....	100
5.1.2	pK <sub>a</sub> -Wert-Verschiebung in Methanol.....	102
5.1.3	NACE-Trennung von Enkephalin-Peptiden und Aspartyl-Dipeptiden.....	104
5.2	<i>Effekte des Lösungsmittels auf die Sekundärstruktur von Polypeptiden</i> .....	105
5.2.1	Selektivität der CE-Trennung $\alpha$ -helikaler Polypeptide in wässrigen und nicht-wässrigen Puffern.....	106
5.3	<i>Charakterisierung des mikroheterogenen Peptaibol-Antibiotikums Alamethicin F30 mittels NACE-ESI-MS</i> .....	110
5.3.1	Peptaibole – Vorkommen, biologische Aktivität und Analytik.....	110
5.3.2	NACE-Trennung der Alamethicin F30-Peptide.....	111
5.3.3	Sequenzierung der ALM F30-Komponenten mittels NACE-ESI-IT-MS <sup>n</sup> .....	115
5.3.4	NACE-ESI-TOF-MS-Messungen.....	118
5.3.5	Quantifizierung der Alamethicin F30-Komponenten.....	121

---

5.4	<i>Bestimmung von Enkephalin-Peptiden mittels NACE-ED</i> .....	123
5.4.1	Optimierung der NACE-Trennmethode in unmodifizierten Quarzkapillaren.....	124
5.4.2	Co-elektroosmotische Trennung PEG-Kapillaren.....	126
5.4.3	CBIA-ED.....	128
5.4.4	NACE-ED.....	129
5.4.5	Bestimmung der Enkephalin-Peptide in gespikten Plasmaproben.....	132
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>139</b>
	Weitere Veröffentlichungen.....	145
	Lebenslauf.....	147

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	Ionisationsgrad
ACN	Acetonitril
A.D.	Außendurchmesser
Aib	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure
ALM	Alamethicin
AmpA	Ampullosporin A
AS	Aminosäure
AU	<i>absorbance unit</i> – Extinktionseinheit
BPE	<i>base peak electropherogram</i> – Basispeakelektropherogramm
CBIA	<i>capillary batch injection analysis</i> – Kapillar-Batch-Injektions-Analyse
CD	Circulardichroismus
CE	<i>capillary electrophoresis</i> – Kapillarelektrophorese
CV	Cyclovoltammetrie
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> – Kapillarzonenelektrophorese
DAD	Dioden-Array-Detektor
$\epsilon$	Dielektrizitätszahl
ED	Elektrochemische Detektion
EIE	<i>extracted ion electropherogram</i> – Elektropherogramm für ein ausgewähltes Ion
EOF	Elektroosmotischer Fluß
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
$\eta$	Dynamische Viskosität
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> – Hochleistungsflüssigchromatographie
I.D.	Innendurchmesser
IS	interner Standard
IT-MS	<i>ion trap mass spectrometry</i> – Massenspektrometrie mit Ionenfallen-Massenanalysator
LE	Leu-Enkephalin
Leuol	Leucinol
LOD	<i>limit of detection</i> – Detektionslimit
$\mu_a$	<i>actual mobility</i> – Mobilität des vollständig ionisierten Analyten
$\mu_e$	<i>effective mobility</i> – effektive Mobilität
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i> – Matrixunterstützte Laserdesorption-Ionisation
ME	Met-Enkephalin
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MS <sup>n</sup>	Tandem Massenspektrometrie
NACE	<i>nonaqueous capillary electrophoresis</i> – nichtwässrige Kapillarelektrophorese



---

PEG	Polyethylenglykol
pH <sub>app</sub>	<i>apparent pH value</i> – scheinbarer pH-Wert in organischen Lösungsmitteln
pH <sub>conv</sub>	<i>conventional pH value</i> – konventioneller pH-Wert in organischen Lösungsmitteln
Pheol	Phenylalaninol
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus einer Säuredissoziationskonstante
Pyr	Pyroglutaminsäure
r	Selektivitätskoeffizient in der Kapillarelektrophorese
R <sub>s</sub>	<i>resolution</i> – Auflösung
SPE	<i>solid phase extraction</i> – Festphasenextraktion
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> – Trifluoressigsäure
TOF-MS	<i>time-of-flight mass spectrometry</i> – Massenspektrometrie mit Flugzeit-Massenanalysator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett

## 1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Peptide repräsentieren eine sehr große und komplexe Gruppe von Biomolekülen, die in allen Lebensbereichen von Organismen eine wichtige Rolle spielen. Sie können u.a. als Hormone, Neurotransmitter und Coenzyme agieren oder als dem Organismus von außen zugeführte Enzyminhibitoren, Toxine und Antibiotika wirken [1]. Peptide und Proteine gewinnen daher auch in der Therapie und der Diagnostik immer größere Bedeutung. Der große Vorteil dieser Substanzklasse liegt in ihrer hohen Aktivität und Spezifität bei relativ geringer systemischer Toxizität. Durch die Entwicklung der rekombinanten DNA Technologie kam es in den letzten Jahren zu einer starken Zunahme der industriellen Herstellung dieser Substanzen [2]. Anhand dieser Entwicklung wird deutlich, dass effektive Analysetechniken für die Qualitätskontrolle dieser biopharmazeutischen Substanzen erforderlich sind. Neue Impulse für die Peptidanalytik entstanden in den letzten Jahren im Rahmen der Proteomforschung, die sich mit der Aufklärung molekularer Eigenschaften, wie Aminosäuresequenz, dreidimensionaler Struktur und biologischer Aktivität, individueller Proteine befasst und von der man sich neue Targets für die Arzneistoffentwicklung verspricht. Die Aufklärung der Proteinstruktur über die Analyse der Peptidfragmente, der so genannte *peptidic approach*, wurde das wichtigste Verfahren der Proteomanalytik [3, 4]. Darüberhinaus sind empfindliche und spezifische Analysenverfahren zur Bestimmung biologisch aktiver Peptide, wie z.B. Neuropeptiden und Peptidhormonen, in Biomatrizes erforderlich.

Die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) hat sich neben der Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) und der Gaschromatographie (GC) zu einer enorm leistungsfähigen Methode der instrumentellen Analytik entwickelt. Seit ihrer Einführung im Jahr 1981 wurde die überwältigende Mehrheit kapillarelektrophoretischer Untersuchungen im wässrigen Milieu durchgeführt. Allerdings ist schon seit 1951 durch Arbeiten von Hayek [5] bekannt, dass Elektrophorese prinzipiell auch im nichtwässrigen Milieu durchführbar ist. Die ersten Untersuchungen mit Hilfe der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese (*nonaqueous capillary electrophoresis*, NACE) wurde bereits 1984 von Walbroehl und Jorgenson [6] beschrieben. Die Vorteile, die aus der Verwendung nichtwässriger Puffersysteme in der CE resultieren, wurden seit Mitte der 1990er Jahre für eine Vielzahl verschiedener Analyten gezeigt [7], wobei Peptide eher die Ausnahme darstellen. Bisher sind lediglich drei NACE-Applikationen zur Peptidanalytik beschrieben: die Enantiomerentrennung von Dinitrobenzoyl-Alanin-Peptid-Enantiomeren mit tert.-Butylcarbamoyl-chinin als chiralem Selektor [8], die Charakterisierung des synthetischen Polypeptides Poly-N<sub>ε</sub>-trifluoroacetyl-L-lysin [9] und die NACE-MS Trennung der lipophilen Peptidantibiotika Bacitracin und Gramicidin S [10].

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Möglichkeiten des Einsatzes nichtwässriger Lösungsmittel für die CE-Analytik von Peptiden zu untersuchen. Dabei sollten sowohl trennmethode Aspekte als auch die Möglichkeiten verschiedener Detektionsverfahren wie der elektrochemischen und der massenspektrometrischen Detektion untersucht werden. Darüberhinaus sollte das Potenzial der NACE anhand praktischer Anwendungsbeispiele aufgezeigt werden.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Sind kapillarelektrophoretische Trennungen von Peptiden prinzipiell auch im nichtwässrigen Milieu möglich?
- Welchen Einfluss haben nichtwässrige Lösungsmittel auf physikochemische Eigenschaften der Analyten, die für die CE-Analyse entscheidend sind, wie z.B. das Dissoziationsverhalten oder die Sekundärstruktur?
- Gibt es Peptide, deren kapillarelektrophoretische Trennung in nichtwässrigen Elektrolytsystemen besser gelingt als in wässrigen?
- Können die in der Literatur beschriebenen Vorteile des Einsatzes nichtwässriger Lösungsmittel in der CE mit elektrochemischer und massenspektrometrischer Detektion auch für die Peptidanalytik genutzt werden?

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurden Lösungsmittelleffekte auf physikochemische Charakteristika und das Migrationsverhalten von Peptiden untersucht. Es sollte festgestellt werden, wie sich das Säure-Base-Verhalten kleiner Peptide beim Wechsel von wässrigen zu nichtwässrigen Puffersystemen verändert. Vor dem Hintergrund, dass die Konformation von Peptiden einen entscheidenden Einfluss auf das Migrationsverhalten hat und organische Lösungsmittel Konformationsänderungen herbeiführen können, bestand eine weitere Aufgabe darin, das Migrationsverhalten verschiedener  $\alpha$ -helikaler Polypeptide in nichtwässrigen Puffern zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Anwendungsbeispiele den praktischen Nutzen der NACE für die Peptidanalytik aufzeigen. Es sollte eine NACE-MS-Methode zur Bestimmung lipophiler Peptide entwickelt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Möglichkeiten der NACE mit elektrochemischer Detektion zur Bestimmung von Enkephalin-Peptiden zu untersuchen, wobei vorwiegend methodische Aspekte im Vordergrund standen.

## 2 Theoretischer Teil

Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese (CE) fasst man verschiedene Trenntechniken zusammen, denen gemeinsam ist, dass durch Anlegen einer Hochspannung (2–35 kV) an eine mit Elektrolyt-lösung gefüllte Kapillare eine Wanderung der Analyten im elektrischen Feld stattfindet. Im engeren Sinne wird darunter die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) verstanden, bei der die Analyten aufgrund ihrer Ladung und Molekülgröße mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im elektrischen Feld wandern und so getrennt werden. Über die CZE hinaus gibt es eine Vielzahl modifizierter CE-Methoden, von denen die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) die größte Bedeutung besitzt. Weiter gebräuchliche Varianten der CE sind die Kapillarisotachophorese (CITP), die elektrokinetische Kapillarchromatographie (ECC), die isoelektrische Fokussierung in Kapillaren (CIEF) und die Kapillargelelektrophorese (CGE).

Die CE wurde 1981 von Jorgenson und Lukacs [11] eingeführt, die erstmals Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 µm nutzten und damit den Begriff der Hochleistungs-kapillarelektrophorese (HPCE) prägten. Erst mit der Einführung solcher englumiger Kapillaren (bis 20 µm) konnte die CE ihre hohe Leistungsfähigkeit entfalten. Durch das große Verhältnis von Oberfläche zu Innendurchmesser ist eine sehr gute Wärmeabführung gegeben. Konvektive Ströme, die als Folge der Jouleschen Wärmeentwicklung Peak- bzw. Bandenverbreiterung induzieren, werden daher weitgehend ausgeschaltet.

Die Aufnahme in das Europäische Arzneibuch [12] und die United States Pharmacopeia (USP) [13] belegt die allgemeine Akzeptanz der CE als analytisches Verfahren.

### 2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

#### 2.1.1 Elektromigration der Analyten

Das grundsätzliche Prinzip der Elektrophorese, die Migration gelöster, geladener Teilchen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes, wurde von Kohlrausch beschrieben. Auf der Grundlage dieses Transportphänomens beruhen alle elektrophoretischen Trennverfahren, ob an festen Trägern oder in freier Elektrolytlösung. Die Trennung geladener Teilchen erfolgt hiernach allein aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Eigenbeweglichkeiten (Mobilitäten).

In einem elektrischen Feld unterliegt das Analyt-Ion einer Beschleunigungskraft  $F_a$

$$F_a = z_i \cdot e \cdot E \quad (1)$$

wobei  $z_i$  die effektive Ladung des Ions,  $e$  die Elementarladung und  $E$  die elektrische Feldstärke darstellen. Ein positiv geladenes Ion (Kation) wird in Richtung der negativ geladenen Elektrode (Kathode) beschleunigt, und umgekehrt bewegt sich ein negativ geladenes Ion (Anion) in Richtung der positiven Elektrode (Anode). Ein beschleunigtes Ion wird durch die Reibungskraft  $F_v$  abgebremst.

Diese Reibungskraft ist entsprechend dem Stokeschen Gesetz proportional zur Geschwindigkeit des Ions ( $v_i$ ), dem Radius des (sphärischen) Ions ( $r_i$ ) und der dynamischen Viskosität des Mediums ( $\eta$ ).

$$F_v = 6 \pi \eta r_i v_i \quad (2)$$

Der Radius  $r_i$  entspricht dem Radius des sphärischen Ions einschließlich der Solvathülle, die das Ion umgibt, und wird als Stokescher Radius bezeichnet. Bei einem migrierenden Teilchen stehen einander entgegengesetzte Kräfte im Gleichgewicht ( $F_a = F_v$ ) und man kann daher nach  $v_i$  auflösen:

$$v_i = \frac{z_i e E}{6 \pi \eta r_i} \quad (3).$$

Die Mobilität eines Ions ( $\mu_i$ ) ist definiert als

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{L_{\text{eff}}}{t_i E} = \frac{L_{\text{eff}} L_{\text{ges}}}{t_i U} \quad (4)$$

wobei  $L_{\text{eff}}$  die effektive Länge der Trennstrecke (Kapillarlänge vom Inlet bis zum Detektor),  $L_{\text{ges}}$  die Gesamtlänge der Kapillare,  $U$  die angelegte Spannung und  $t_i$  die Migrationszeit darstellen. Aus der Kombination von Gleichung 3 und 4 folgt für die Mobilität eines sphärischen Ions in einer inkompressiblen unendlich verdünnten Lösung mit der dynamischen Viskosität  $\eta$  [14]:

$$\mu_i = \frac{z_i e}{6 \pi \eta r_i} \quad (5).$$

Diese Voraussetzungen sind in der CE allerdings nicht vollständig erfüllt. Einerseits sind die Analyt-Ionen vorwiegend nicht sphärisch geformt, und andererseits werden CE-Messungen in einer Pufferlösung durchgeführt, um stabile pH-Bedingungen zu garantieren. Darüber hinaus berücksichtigt die Gleichung 5 nicht den Einfluss der Elektrolytkonzentration auf Ion-Ion-Wechselwirkungen, die entscheidend die Mobilität mitbestimmen. Trotz der Vereinfachungen charakterisiert die Gleichung 5 den Einfluss der wichtigsten Parameter auf das Verhalten eines Analyten in der CE. Die Ionenladung, der Stokesche Radius und die Viskosität des Elektrophoresepuffers bestimmen daher entscheidend die Mobilität des Analyten.

Die Einflussnahme der Ionenstärke des Puffers auf die Mobilität eines geladenen Teilchens wird durch die Debye-Hückel-Onsager-Theorie beschrieben. Danach ist ein migrierendes Zentral-Ion von einer unsymmetrischen Solvat- und Ionenatmosphäre umgeben, die Puffer-Ionen entgegengesetzter Ladung enthält. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes werden positive und negative Ionen in entgegengesetzte Richtungen beschleunigt, d.h. die beschriebene Ladungsverteilung wird gestört. Um ein wanderndes Ion muss sich daher die Ionenwolke ständig neu ausbilden. Es resultiert eine Rückhaltekraft zwischen Zentral-Ion und entgegengesetzt geladener Ionenwolke, die umso größer

wird, je näher die einzelnen Ladungsträger einander im Mittel kommen, d.h. je größer die Konzentration der Ionen ist. Die Migrationsgeschwindigkeit des Zentral-Ions wird infolge der unsymmetrischen Ladungsverteilung in der Ionenwolke, seiner reduzierten Ladung sowie dem aufgeweiteten Radius abgebremst [14].

### 2.1.2 Elektroosmose

Neben der elektrophoretischen Eigenwanderung geladener Analyten unter dem Einfluss des elektrischen Feldes tritt bei allen elektrophoretischen Verfahren noch ein weiteres Transportphänomen auf, der elektroosmotische Fluss (EOF). Der EOF beschreibt eine Strömung des Puffermediums unter dem Einfluss des elektrischen Feldes als Folge von Grenzflächenphänomenen zwischen Gefäßwand und Elektrolytlösung.

Durch die Dissoziation der Silanolgruppen an der Innenfläche der Quarzkapillare wird die Kapillarwand negativ geladen. Aufgrund der elektrostatischen Anziehung adsorbieren hauptsächlich Kationen aus dem Puffer an die Oberfläche und bilden eine unverschiebbare, kompakte Schicht, wodurch die negative Überschussladung abgeschwächt wird. Von dieser Schicht ausgehend folgt in Richtung der Flüssigkeit eine zweite, diffuse Schicht aus vorwiegend solvatisierten Kationen. Beide Schichten zusammen werden als Helmholtz- oder Stern-Doppelschicht bezeichnet. Das elektrische Potenzial an der Scherfläche dieser Doppelschicht wird als Zetapotenzial ( $\zeta$ ) bezeichnet. Unter der Wirkung eines elektrischen Feldes, beginnen sich die Kationen der diffusen Schicht in Richtung Kathode zu bewegen. Infolge eines osmotischen Effekts bewegt sich auch das sie umgebende Lösungsmittel mit, und es kommt zu einem Nettostrom der Pufferlösung in Richtung Kathode. Da sowohl die treibende Kraft des Flusses als auch die Reibung von der Kapillarwand ausgehen, resultiert ein sehr flaches, stempelförmiges Strömungsprofil. Im Gegensatz zur HPLC, bei der ein parabolförmiges Strömungsprofil auftritt, spielt die Peakdispersion durch Radialdiffusion nur eine untergeordnete Rolle.

Die elektroosmotische Mobilität lässt sich vereinfacht mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung beschreiben:

$$\mu_{\text{EOF}} = - \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta}{\eta} \quad (6).$$

Der EOF ist demzufolge umgekehrt proportional zur Viskosität der Elektrolytlösung und direkt proportional zu seiner Viskosität sowie dem Zetapotenzial. Die Größe des Zetapotenzials ist wiederum abhängig von der Dicke der Helmholtz-Doppelschicht ( $\kappa^{-1}$ ) und der Oberflächenladungsdichte ( $\sigma$ ):

$$\zeta = \frac{\sigma}{\epsilon_0 \epsilon \kappa} \quad (7).$$

Der reziproke Wert der Doppelschichtdicke ( $\kappa$ ), der so genannte Debye-Hückel-Parameter, verhält sich zur Ionenstärke ( $I$ ) entsprechend der folgenden Gleichung:

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 F^2}{\epsilon_0 \epsilon R T}} I \quad (8)$$

wobei  $F$  die Faraday-Konstante und  $R$  die allgemeine Gaskonstante darstellen. Die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{\text{EOF}}$  ist entsprechend den Gleichungen 6-8 umgekehrt proportional zur Quadratwurzel der Ionenstärke ( $I$ ) und direkt proportional zum Quotienten aus Dielektrizitätszahl ( $\epsilon$ ) und Viskosität ( $\eta$ ).

Das Ausmaß und die Richtung des EOF sind entscheidend für die Optimierung von Trennung und Analysenzeit in der CE [15]. Prinzipiell können geladene Verbindungen im *co*- oder *counter*-elektroosmotischen Modus getrennt werden. Die Wahl der Trennbedingungen richtet sich zum einen nach der Eigenmobilität der Analyten im jeweiligen Puffer und zum anderen nach dem Ausmaß und der Richtung des EOF. Negativ geladene Verbindungen müssen beispielsweise dann im *co*-elektroosmotischen Modus bestimmt werden, wenn ein zur Kathode gerichteter EOF vorliegt, der eine größere Mobilität besitzt als das Analyt-Ion selbst. Um aber in Quarzkapillaren einen EOF zu erzeugen, der in Richtung Anode fließt, muss die Innenwand der Kapillare modifiziert werden. Beispielsweise kann mit Hilfe grenzflächenaktiver kationischer Verbindungen, die an die Kapillarwand adsorbieren und eine kationische Doppelschicht ausbilden, der EOF umgekehrt werden.

Prinzipiell stehen zwei verschiedene Techniken zur Beschichtung (*coating*) der Kapillarwand zur Verfügung. Die dynamische Belegung durch einen geeigneten Pufferzusatz verringert die Anzahl negativer Ladungen an der Kapillarwand durch Ladungskompensation (kationische Tenside, Polykationen) oder durch Film- bzw. Gelbildung (Polymere) [16]. Im Gegensatz zur dynamischen Belegung, wo Adsorptionsphänomene für die Anhaftung des EOF-Modifizierers an die Kapillarwand verantwortlich sind, basiert die statische Kapillarbelegung auf kovalenten Bindungen zwischen der Kapillarwand und dem *Coating*-Material [17].

Neben der gezielten Manipulation des EOF, wird die Modifizierung der Kapillarwand hauptsächlich zur Unterdrückung unerwünschter Wechselwirkungen zwischen Probenmolekülen und Kapillarwand genutzt. Vor allem bei bioanalytischen CE-Applikationen, wie z.B. der Qualitätskontrolle rekombinanter Proteine [18], der Proteomforschung [19] oder dem Therapeutischen Drug Monitoring von Arzneistoffen ohne Probenaufreinigung [20], wurde die Adsorption großer Biomoleküle beschrieben. Diese Wechselwirkungen mit der Kapillarwand führen zu einer verschlechterten Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten, zur Peakverbreiterung und Peakasymmetrie und sogar zu irreversibler Adsorption von Probenbestandteilen. Die Tendenz zur Adsorption an die Kapillarwand steigt dabei mit zunehmender Molekülgröße und erfordert bei Molekülen mit einer Molekülmasse  $> 50.000$  den Einsatz modifizierter Kapillaren [21].

## 2.2 Detektion

Prinzipiell unterscheidet man in der CE optische Detektionsverfahren (UV-Vis-, Fluoreszenzdetektion), elektrochemische Detektionsverfahren (amperometrische, konduktometrische und potentiometrische Detektion) und die massenspektrometrische Detektion. Kapillarelektrophoretische Trennverfahren stellen hohe Anforderungen an den Aufbau der Detektoren, welche mit extrem kleinen Flüssigkeitsvolumina kompatibel sein müssen. Sowohl optische Detektionsverfahren als auch die konduktometrische Detektion erlauben eine *on-capillary* Detektion, d.h. die Detektionszelle ist Teil der Trennkapillare. Im Gegensatz dazu sind amperometrische, potentiometrische und massenspektrometrische Detektoren in der Regel in einer *end-capillary* Anordnung am Ende der Trennkapillare positioniert.

### 2.2.1 Optische Detektionsverfahren

Das am häufigsten verwendete Verfahren in der CE ist die UV-Vis-Detektion. Nahezu universell lassen sich zwischen 195 und 210 nm die meisten organischen Analyten erfassen. Bei Analyten, die über den gesamten UV-Bereich nur kleine molare Extinktionskoeffizienten besitzen (Kohlenhydrate, anorganische Ionen), ist eine direkte Detektion bei Wellenlängen  $> 190$  nm aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht möglich, jedoch können mit Hilfe der indirekten UV-Detektion auch solche UV-inaktiven Substanzen nachgewiesen werden. Durch Zusatz eines UV-absorbierenden Ions zum Puffer wird hierbei ein hohes Hintergrundsignal erzeugt, das beim Passieren der Analytzone abgeschwächt wird und so eine „negative“ Absorption erzeugt [22]. Eine weitere Möglichkeit, UV-inaktive Substanzen zu analysieren, bietet die Derivatisierung der Analyten mit geeigneten Reagenzien [23]. Derivatisierungen finden vor allem bei der Analyse von Kohlenhydraten [24], Aminosäuren [25] und anorganischen Ionen [26] Anwendung. Durch die Verwendung von Dioden-Array-Detektoren, welche die Aufnahme von UV-Spektren während der Detektion erlauben, können unvollständig getrennte Peaks identifiziert und die Einzelkomponenten quantifiziert werden [27].

Aufgrund der Verwendung von CE-Kapillaren mit kleinsten Innendurchmessern ( $< 100 \mu\text{m}$ ), die nötig sind um hohe Trenneffizienzen zu erzielen, und der damit verbundenen kleinen Detektionsschichtdicke, ergibt sich eine geringe Konzentrationsempfindlichkeit der UV-Detektion. Um die Schichtdicke zu vergrößern, können Kapillaren eingesetzt werden, die am Detektionsfenster blasenförmig aufgeweitet sind (*Bubble-Zellen*). Alternativ lässt sich der Strahlengang verlängern, indem durch ein Z-förmige geformtes Teilstück der Kapillare detektiert wird [28]. Trotz der Verwendung dieser Detektionszellen zeigt die UV-Detektion relativ schlechte Nachweisgrenzen, die meist im Bereich von  $10^{-6}$  M liegen [29].

Als zweites optisches Detektionsverfahren in der CE ermöglicht die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF-Detektion) die Erfassung von Analytkonzentrationen bis weniger als  $10^{-13}$  M [29]. LIF-Detektoren werden vorwiegend in biologischen Applikationen für die Bestimmung von Analyten mit primärer Aminogruppe, wie Aminosäuren, Peptiden und Proteinen [30], und bei der DNA-Sequenzierung [31] genutzt. Ein Nachteil der LIF-Detektion ist die fehlende native Fluoreszenzaktivität vieler Analyten. In gleicher Weise wie bei der UV-Detektion lassen sich Substanzen, die keine



Fluoreszenz zeigen, erst im Anschluss an eine Derivatisierung mit geeigneten Fluorophoren erfassen. Bei Verwendung von fluoreszierenden Pufferadditiven, wie z. B. Natriumsalicylat, kann auch eine indirekte Detektion vorgenommen werden [32], wobei allerdings im Vergleich zur direkten LIF-Detektion wesentlich schlechtere Nachweisgrenzen von  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  M resultieren.

### 2.2.2 Elektrochemische Detektionsverfahren

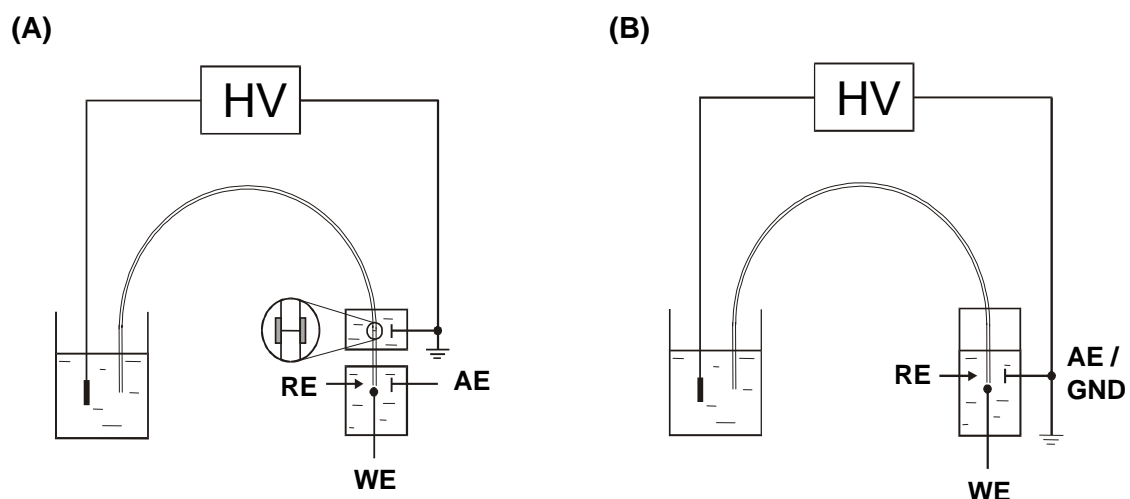
Im Bereich der elektrochemischen Detektion (ED) unterscheidet man nach den genutzten Messprinzipien drei verschiedene Varianten: die amperometrische, potentiometrische und konduktometrische Detektion. Einige Autoren ordnen die konduktometrische Detektion nicht den elektrochemischen Detektionsverfahren zu, da hierbei keine elektrochemischen Umsätze wie Oxidation oder Reduktion stattfinden, sondern lediglich Leitfähigkeitsunterschiede zwischen Probenzone und Trägerelektrolyt gemessen werden [33]. Die elektrochemische Detektion zeichnet sich vor allem durch ihre hohe Empfindlichkeit und Selektivität und durch einen großen Linearitätsbereich aus [34]. Weiterhin sind elektrochemische Detektionsverfahren nicht massen- sondern konzentrationsempfindlich was bedeutet, dass eine Verkleinerung der Detektionszelle nicht mit einer verringerten Empfindlichkeit einhergeht [35]. Die häufigsten CE-ED-Anwendungen nutzen die amperometrische Detektion. Allerdings gewinnen konduktometrische Detektionsverfahren, dank der Entwicklung einfacher Zwei-Elektroden-Anordnungen, zunehmend an Bedeutung. CE-ED-Verfahren werden in der Routineanalytik eher selten genutzt und finden vorwiegend in der Forschung eine Anwendung, da mit Ausnahme zweier konduktometrischer Detektoren elektrochemische Detektoren für die CE derzeit kommerziell noch nicht erhältlich sind. Die Entwicklung von amperometrischen Einwegdetektoren soll eine breitere Anwendung dieser Detektionstechnik für die CE ermöglichen [36]. Aufgrund der verhältnismäßig einfachen Miniaturisierung elektrochemischer Detektoren (ohne Empfindlichkeitsverlust) und der geringen instrumentellen Anforderungen galt in den letzten Jahren ein besonderes Interesse der Entwicklung amperometrischer Detektionsverfahren in CE-Mikrochips („lab-on-a-chip“) [37].

Im Bereich der Bioanalytik werden CE-ED-Methoden vorwiegend im Bereich der so genannten Einzelzellanalysen genutzt [38], da das benötigte Probenvolumen für CE-Analysen nur wenige Nanoliter beträgt und die ED die Bestimmung elektroaktiver Substanzen mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität erlaubt. Die meisten Applikationen dieser Art beschäftigen sich mit der Bestimmung der elektrochemisch aktiven Cathecholamine Dopamin, Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin in einzelnen Neuronen oder Lymphozyten [39, 40]. Darüberhinaus sind auch CE-ED-Methoden zur Einzelzellanalyse von Glutathion, Tryptophan, Diclofenac und Ascorbinsäure in verschiedenen Zellen beschrieben [41-43].

Amperometrische Detektoren registrieren den Stromfluss an einer Arbeitselektrode (WE), an welcher gegenüber einer Referenzelektrode (RE) eine Spannung angelegt wird, die im Diffusionsgrenzstrombereich der voltammetrischen Strom-Spannungs-Kurve liegt. CE mit amperometrischer Detektion kann zur Analyse einer Vielzahl elektrochemisch aktiver Analyten genutzt werden, vor allem biogenen Aminen, Aminosäuren, Peptiden, Neurotransmittern, phenolischen Verbindungen und Kohlenhydraten [44]. Dabei kommen scheibenförmige Mikroelektroden mit einem Durchmesser von

10-50  $\mu\text{m}$ , bestehend aus Kohlenstoff, Platin oder Gold, zum Einsatz. Ein wesentliches Problem der elektrochemischen Detektionsverfahren ist der störende Einfluss der Hochspannung auf den elektrochemischen Detektor. Den hohen Trennspannungen von 5-30 kV und den dabei resultierenden elektrophoretischen Strömen im  $\mu\text{A}$ -Bereich stehen elektrochemische Detektionspotenziale von etwa 1 V und Detektionsströme im pA-Bereich gegenüber. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, Hochspannung und Detektion voneinander abzukoppeln. Bei der *off-capillary* Anordnung der Detektionselektroden wird die elektrochemische Detektionszelle durch eine Transferkapillare, die über ein poröses Kopplungsstück mit der Trennkapillare verbunden ist, vom Einfluss des Hochspannungsfeldes abgetrennt (Abbildung 1). Der elektrophoretische Strom fließt durch dieses Kopplungsstück zur Hochspannungselektrode, die sich im umgebenden Elektrolytgefäß befindet, und der EOF drückt den Trägerelektrolyten und die Analyten durch die Transferkapillare zur Detektionszelle. Eine Alternative ist die so genannte *end-capillary* Detektion, bei der die Detektionselektrode direkt an der Auslassöffnung der Trennkapillare positioniert wird. Um den Einfluss des Hochspannungsfeldes auf die Detektion zu verringern, müssen allerdings bei dieser Detektionsvariante Trennkapillaren mit sehr geringem Innendurchmesser ( $< 25 \mu\text{m}$ ) genutzt werden. Dadurch erhöht sich der elektrische Widerstand der Kapillare und der gesamte Spannungsabfall erfolgt praktisch innerhalb der Kapillare. Allerdings verursacht die Verwendung solcher englumiger Kapillaren vermehrt die Entstehung von Luftblasen in der Kapillare und deren Verstopfung. Darüberhinaus werden an die Positionierung der Detektionselektrode hohe Anforderungen gestellt, da für sensitive Messungen ein sehr kleiner Abstand zwischen Kapillarauslass und Detektionselektrode nötig ist. Dieser Abstand sollte etwa dem Innendurchmesser der Kapillare entsprechen, also je nach Kapillare 5-25  $\mu\text{m}$  betragen [45].

Potentiometrische Detektoren zählen auf dem Gebiet der CE noch zu den Ausnahmen. Ionenselektive Mikroelektroden, basierend auf Flüssigmembranen, sind schon lange bekannt, sodass deren Anwen-



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für die CE mit amperometrischer Detektion (A) mit Hochspannungsentkoppler und (B) ohne die Verwendung eines Entkopplers (end-capillary Detektion). AE - Gegenelektrode (auxiliary electrode); RE - Referenzelektrode; WE - Arbeitselektrode (working electrode); GND - Erdungspotenzial (ground); HV - Hochspannung (high voltage).

dung als CE-Detektor naheliegend war. Praktische Anwendungen sind allerdings spärlich und kommerzielle Geräte nicht verfügbar.

Konduktometrische Detektoren haben sich bisher besonders für CE-Trennungen anorganischer Ionen und niedermolekularer Säuren bewährt [46, 47]. Diese UV-inaktiven Analyten werden häufig mit indirekter UV-Detektion bestimmt, die im Vergleich zur konduktometrischen Detektion eine geringere Empfindlichkeit aufweist. Wie bei den optischen Detektionsverfahren liegt bei der konduktometrischen Detektion eine *on-capillary* Anordnung der Detektionselektroden vor [46]. Durch die Verfügbarkeit kommerziell erhältlicher Detektoren (1994, Crystal 1000 CE [48] und 2004, TraceDec<sup>®</sup> [49]) wird dieses Detektionsverfahren noch breitere Anwendung finden, wobei die Spurenanalytik anorganischer und kleiner organischer Ionen im Vordergrund stehen dürfte.

### 2.2.3 Massenspektrometrische Detektion

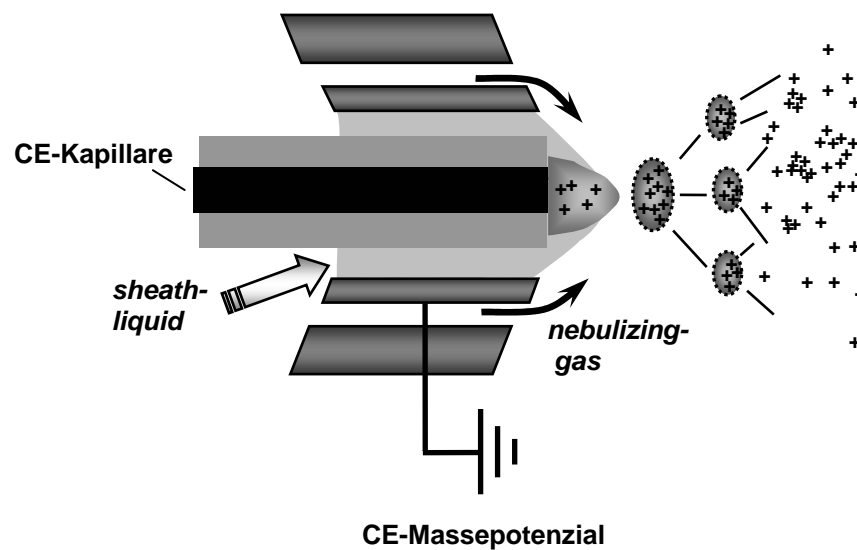
Die online Kopplung der CE mit einem Massenspektrometer (MS) als Detektionsmethode hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung zugenommen. Dieser Trend ist damit zu begründen, dass neben der hohen Detektionsempfindlichkeit der CE-MS-Kopplung Informationen zur Strukturaufklärung der getrennten Analyten erhalten werden.

#### 2.2.3.1 CE-MS Kopplung

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ist mit Abstand das häufigste Ionisationsverfahren zur massenspektrometrischen Detektion in der CE [50, 51]. Unter dem Einfluss einer Hochspannung werden die Analyt-Ionen unter Atmosphärendruck aus dem CE-Puffer in die Gasphase überführt (Desolvatisierung). Charakteristisch für den ESI-Prozess ist, dass es überwiegend zur Bildung mehrfach geladener Quasimolekül-Ionen kommt. Da die gängigen Massenspektrometer einen begrenzten Massenbereich haben, ist durch die Bildung dieser mehrfach geladenen Ionen auch die Bestimmung hochmolekularer Analyten wie z. B. Proteinen möglich. Das ESI-Verfahren gehört zu den weichen Ionisationstechniken, sodass selbst empfindliche Moleküle und teilweise sogar nichtkovalente Aggregate unzersetzt in das Massenspektrometer gelangen können. Fragmentierungen finden während des Ionisationsprozesses selten statt, wodurch auch Molekulargewichtsbestimmungen mittels ESI-MS möglich sind [52].

Die Desolvatisierung gelöster Ionen unter dem Einfluss einer Hochspannung sowie eines Stickstoffstromes erfolgt im Wesentlichen in vier Schritten [51, 53]:

- (1) Bildung kleiner geladener Tröpfchen aus der Elektrolytlösung,
- (2) kontinuierlicher Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch Verdampfen, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt,
- (3) spontaner Zerfall der Tröpfchen aufgrund der Abstoßungskräfte zwischen gleichnamigen Ladungen (Coulomb-Explosion) zu Mikrotröpfchen,
- (4) Bildung gasförmiger Ionen durch Lösungsmittelverdampfung.

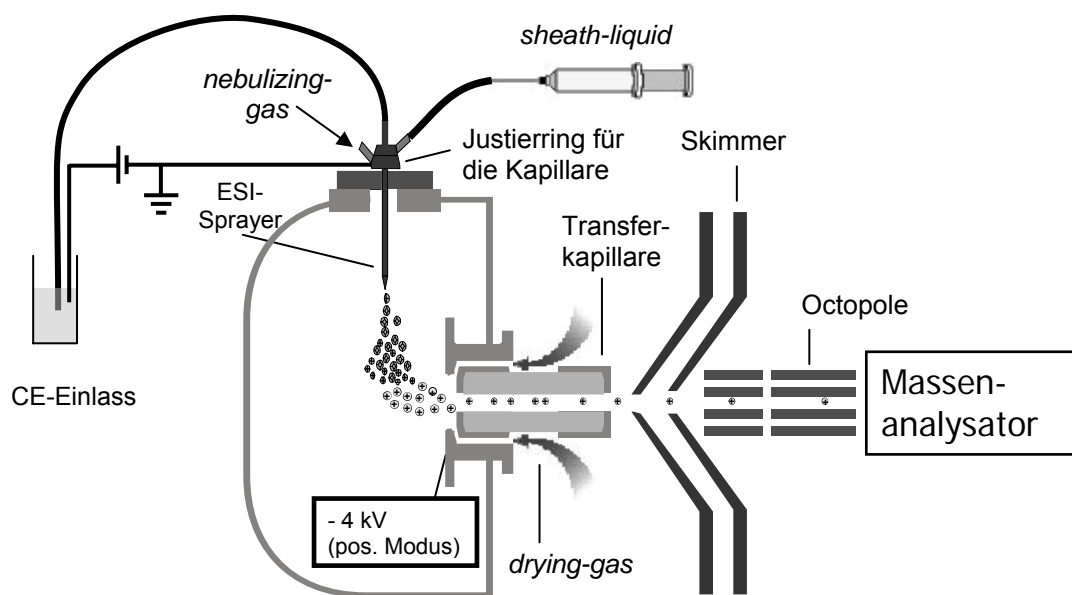


**Abbildung 2.** Schematische Darstellung eines CE-ESI-MS sheath-flow Interfaces. (Quelle: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)

Die ESI-Kopplung zwischen CE und Massenspektrometer erfolgt in den meisten Fällen (77% [51]) über ein so genanntes *sheath-flow* Interface. Das Anlegen eines solchen „Schönungsflusses“ (*sheath-flow*) von etwa 2-10 µl/min ist nötig, um eine für den ESI-Prozess ausreichend hohe Flussrate zu gewährleisten, die wesentlich höher sein muss als der in der CE vorliegende EOF (200-400 nL/min). Zusätzlich verhindert der *sheath-flow* die Entstehung eines Druckgefälles an der CE-Kapillare durch das an der Ionenquelle angelegte Vakuum. Effizienzverluste der CE-Trennung durch die Ausbildung eines hydrodynamischen Flusses mit parabolischem Strömungsprofil (vgl. Abschnitt 2.1.2) werden dadurch vermieden. Darüberhinaus erhöht der *sheath-flow* die Stabilität des Elektrosprays und hilft, den elektrischen Kontakt zum Massepotenzial an der Auslassseite der CE-Kapillare herzustellen. Als *sheath-liquid* werden Mischungen aus Wasser mit Methanol, Acetonitril oder Isopropanol mit einem geringen Zusatz von Ameisensäure bzw. Ammoniak eingesetzt.

Der Aufbau eines CE-ESI-MS *sheath-flow* Interfaces ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die Trennkapillare ist coaxial von einer Stahlkapillare mit größerem Durchmesser umgeben, durch die das *sheath-liquid* zur Spitze der ESI-Nadel geleitet wird. Durch eine dritte, äußere Stahlkapillare wird das *sheath-gas* geleitet, das die Tröpfchenbildung unterstützen soll.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die entstehenden gasförmigen Ionen in das Hochvakuum des Massenanalysators zu überführen. Der ESI-Spraykegel kann auf eine Interfaceplatte mit einer runden Öffnung gerichtet werden, hinter der sich eine weitere Platte mit einer kleineren Öffnung (*orifice*) befindet. Zwischen den Platten strömt Stickstoff als eine Art Vorhang (*curtain*) dem Elektrospray entgegen und unterstützt die Desolvatisierung der Ionen. Wegen des geringen Durchmessers des *orifice* (100 µm) kann dahinter ein Vakuum aufgebaut werden. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, den Spraykegel auf eine beheizte Stahlkapillare (Innendurchmesser 100 µm) zu richten, die den Übergang zum Vakuumsystem des Massenspektrometers ermöglicht. Auch die Anordnung der ESI-Nadel zur Flugachse der Ionen ist bei verschiedenen Gerätemodellen unterschiedlich. Die neuere



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung eines orthogonalen ESI sheath-liquid Interface. (Quelle: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)

orthogonale Anordnung soll verhindern, dass Lösungsmittelmoleküle und andere ungeladene Matrixbestandteile in das Massenspektrometer gelangen, während die Ionen aufgrund der Potenzialdifferenz eingesaugt werden (Abbildung 3). Nachdem die Ionen das *orifice* bzw. die Transferkapillare passiert haben, werden sie mit Hilfe der so genannten Ionenoptik, zu der Skimmer, Linsen, Octapole u. a. zählen, weiter fokussiert, bevor sie in den Massenanalysator gelangen.

Neben dem *sheath-liquid* Interface gibt es noch zwei weitere Konzepte zur Konstruktion eines CE-ESI-MS-Interface, das *sheathless* und das *liquid-junction* Interface. Beim *sheathless* oder Nanospray-Interface, das ohne Hilfsflüssigkeit auskommt, wird das aus der ESI-Nadel herausragende Ende der CE-Kapillare vergoldet [54]. An dieser Goldspitze wird eine Verbindung zur ESI-Hochspannungsquelle hergestellt. Im Vergleich zum *sheath-flow* Interface zeigt das *sheathless* Interface eine wesentlich höhere Detektionsempfindlichkeit. Das ist damit zu erklären, dass eine Verdünnung der Lösung durch das *sheath-liquid* im Nanospray-Interface nicht stattfindet. Beim *liquid-junction* Interface wird die CE-Kapillare über ein spezielles T-Stück mit einer düsenartigen Spitze und einem Pufferreservoir verbunden, über das der elektrophoretische Stromkreis geschlossen wird [55]. Vorteilhaft ist dabei die vollständige Entkopplung zwischen CE und ESI. Andererseits ist die Justierung des möglichst totvolumenarmen T-Stücks und der Verlust an Trenneffizienz während des Transfers durch den ESI-Emitter problematisch.

Eine wichtige Einschränkung bei der CE-ESI-MS-Kopplung besteht darin, dass die verwendeten CE-Puffer nur flüchtige Bestandteile enthalten sollten. Die Auskristallisation anorganischer Salze, wie etwa Phosphatpuffer, kann zur Verstopfung der ESI-Nadel oder zu einer Verunreinigung des Massenspektrometers führen. Daher werden in CE-ESI-MS-Applikationen überwiegend flüchtige Puffersysteme basierend auf Ammoniumacetat, Essigsäure, Ammoniumformiat, Ameisensäure, Ammonium-

hydrogencarbonat und Ammoniak eingesetzt [52]. Außerdem sollte der CE-Puffer eine möglichst geringe Leitfähigkeit bzw. Ionenstärke aufweisen, um eine optimale Empfindlichkeit der MS-Detektion zu gewährleisten [56].

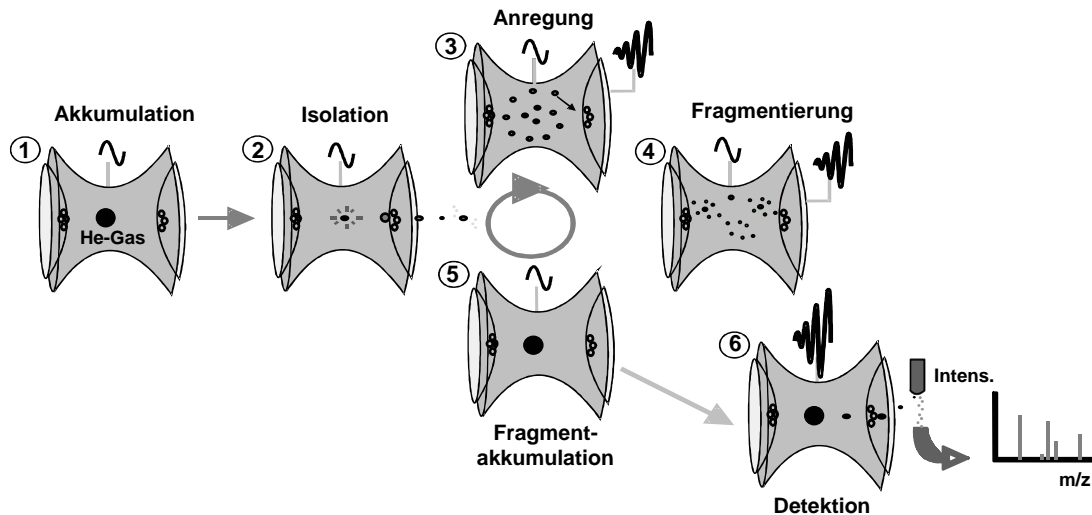
Die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) und in neuester Zeit auch die Photoionisation unter Atmosphärendruck (*atmospheric pressure photo ionization*, APPI) sind als alternative Ionisationsverfahren für eine CE-MS-Kopplung interessant, da sie auch weniger polare Substanzen ionisieren können und eine größere Toleranz gegenüber nichtflüchtigen Hintergrundelektrolyten zeigen [57, 58].

### 2.2.3.2 Massenanalysatoren

Die Trennung der gebildeten Ionen erfolgt im Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ). Die Verwendung von Quadrupol (Q)-, Ionenfallen (*ion trap*, IT)-, Flugzeit (*time-of-flight*, TOF)- und FTICR (Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz)-Massenanalysatoren wurden für die CE-MS-Kopplung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit kamen IT- und TOF-Massenanalysatoren zum Einsatz.

Das Q-MS, das im Prinzip einen Massenfilter darstellt, wird am häufigsten in CE-MS-Kopplungen genutzt und soll daher kurz vorgestellt werden. Durch die Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden (Quadrupol) werden unter dem Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis zum Detektor durchgelassen. Die Einsatzmöglichkeiten dieses Massenanalysators werden allerdings durch eine langsame Scan-Geschwindigkeit, geringe Massenauflösung und geringe Empfindlichkeit im Full-Scan-Modus begrenzt. Gezielte Fragmentierung von Molekülen zum Erhalt von Strukturinformationen sind nur sehr begrenzt möglich. Mit Hilfe so genannter Triple-Quadrupole (QqQ)-Massenanalysatoren kann man über die Massenanalyse der ESI-Ionen hinaus auch gezielte Strukturinformationen über einzelne Ionen erhalten. In einem solchen QqQ-MS dient der erste Quadrupol zur Massenanalyse der Ionen, der zweite zum Hindurchleiten der Ionen durch eine mit Gas (Stickstoff, Helium oder Argon) gefüllte Kollisionskammer und der dritte wiederum zum Scannen der Ionen. Diese Anordnung erlaubt nun eine gezielte Fragmentierung in der Kollisionszelle (*collision induced decay*, CID) und die Massenanalyse der Fragmente (Tochter-Ionen). Solche MS/MS (*mass selection/mass separation*)- oder Tandem-MS Analysen werden häufig zur Sequenzierung von Peptiden genutzt.

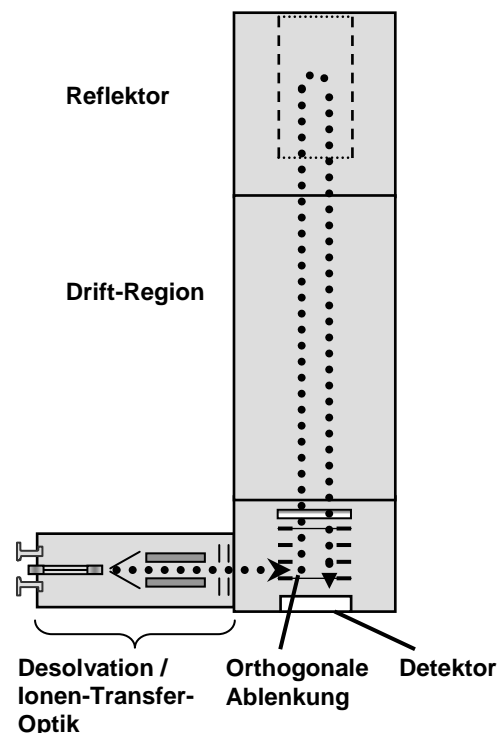
Die Ionenfalle (*ion trap*, IT) ist ein Massenanalysator, der aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden mit zentrischen Öffnungen besteht (Abbildung 4). Die Ionen werden in einem dreidimensionalen Quadrupolfeld für variable Zeiten (Mikrosekunden bis Sekunden) auf stabilen Bahnen gehalten und können dann nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis analysiert werden. Die Funktion der Ionenfalle basiert im Wesentlichen auf demselben physikalischen Prinzip wie der Quadrupol. Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich, d.h. es wird ein bestimmter Zyklus von Füllung und Massenanalyse durchlaufen. Wegen der hohen Geschwindigkeit dieses Prozesses kann die Ionenfalle dennoch zur online Detektion verwendet werden. Die große Bedeutung der IT-MS-Geräte liegt darin begründet, dass MS/MS und sogar  $MS^n$  Spektren ( $n = 3 - 10$ ) aufgenommen werden können. Hierbei



**Abbildung 4.** Funktionsweise eines IT-Massenanalysators. (Quelle: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)

wird das in der Falle befindliche Heliumgas ähnlich wie in der Kollisionszelle eines Triple-Quadrupols für Fragmentierungen benutzt. Zunächst wird das gewünschte Ion in der Ionenfalle isoliert. Die Isolation kann sehr genau ausgeführt werden. Selbst einzelne Isotopomere aus einer Isotopenverteilung können auf diese Weise selektiert werden. Danach werden diese Ionen durch Anlegen einer entsprechenden Frequenz an den Endkappen beschleunigt und es kommt zur Fragmentierung durch eine Kollision mit den Helium-Atomen (CID). Die Fragmente werden anschließend aus der Falle ejiziert und detektiert.

In TOF-Massenanalysatoren wird den Ionen durch das Anlegen einer bestimmten Beschleunigungsspannung eine gleich große kinetische Energie (einige keV) verliehen. Nach dem Verlassen dieses Beschleunigungsfeldes durchlaufen sie eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis aufgetrennt werden. Dies gelingt, da Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten – bei gleicher kinetischer Energie – unterschiedliche Geschwindigkeiten haben. Die meisten ESI-TOF-MS-Geräte nutzen das Prinzip der orthogonalen Ionenextraktion (*orthogonal TOF*), d.h. der eintretende Ionenstrahl wird im Ionenbeschleuniger einem pulsierenden elektrischem Feld ausgesetzt, das die Ionen im rechten Winkel zu Ihrer Eintrittsachse beschleunigt [59]. Der Aufbau eines orthogonalen TOF-Massenanalysators ist schematisch in Abbildung 5



**Abbildung 5.** Schematische Darstellung eines orthogonalen TOF-MS-Massenanalysators. (Quelle: Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)

dargestellt. Die orthogonale Anordnung der Ionenquelle ist entscheidend für die Kopplung von kontinuierlicher (Elektrospray-) Ionisation und diskontinuierlicher Arbeitsweise des Massenanalysators [60]. TOF-MS-Geräte haben eine höhere Scangeschwindigkeit (bis zu 20 Spektren/s) als IT- oder Q-MS-Geräte, geringe Nachweisgrenzen und eine sehr hohe Massenauflösung. Durch die Verwendung von Reflektoren am Ende des Flugrohres, die Unschärfefeffekte beim Start der Ionen ausgleichen, wird die Massenauflösung zusätzlich verbessert. Das in dieser Arbeit genutzte micrOTOF<sup>®</sup>-Gerät der Firma Bruker erreicht eine Massengenauigkeit von 5 ppm (entspricht  $\pm 0.005$  Da bei einem Ion von  $m/z$  1000 Da). TOF-MS-Geräte sind daher ideal für exakte Molekulargewichtsbestimmungen geeignet. Gezielte Fragmentierungen der Ionen sind aufgrund der fehlenden MS/MS-Fähigkeit nicht möglich. Allerdings ist mittlerweile auch eine Q-TOF-MS-Hybrid-Konfiguration in Kombination mit der CE beschrieben, die die hohe Massenauflösung des TOF-Analysators mit der MS/MS-Fähigkeit kombiniert [61].

Die Verwendung magnetischer Ionenfallen (FTICR-MS) zeichnet sich einerseits durch eine exzellente Massengenauigkeit ( $< 1$  ppm) und eine hohe Empfindlichkeit aus. Andererseits ermöglichen sie MS<sup>n</sup>-Experimente. Aufgrund der hohen Kosten solcher Geräte werden CE-ESI-FTICR-MS-Kopplungen aber eher die Ausnahme bleiben. Da solche Analysatoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genutzt wurden, soll auf eine nähere Beschreibung verzichtet werden.



### 2.3 Kapillarelektrophorese von Peptiden

Peptide gehören zu den wichtigsten biologisch aktiven Substanzen und gehören zusammen mit Proteinen und Nucleinsäuren zu den größten Substanzklassen, die mit Hilfe der CE analysiert werden [62-64]. Sie wirken als Hormone, Neurotransmitter, Antibiotika, Coenzyme, Enzyminhibitoren, Toxine, und Arzneistoffe und sind an der Regulation wichtiger Lebensprozesse beteiligt [1]. Die große biologische Bedeutung dieser Stoffklasse spiegelt sich auch in einer Vielzahl von CE-Applikationen zur Peptidanalytik wider wie z.B. Qualitätskontrolle und Reinheitsbestimmung, Bestimmung in biologischen Matrices, enzymatischen Umsetzungen, Aminosäure- und Sequenzanalytik [62].

Aber auch die intensive Proteomforschung der letzten Jahre, von der man sich neue Ansätze für die Arzneimitteltherapie verspricht, führte auf dem Gebiet der Peptidanalytik zu einer rasanten Entwicklung, da die Proteincharakterisierung in der Regel über deren Peptidfragmente erfolgt [3, 4]. Dieses so genannte *peptide mapping*, das als Methode auch in den gängigen Arzneibüchern [12, 13] aufgeführt ist, hat sich zu einem wichtigen Instrument der Proteinanalytik entwickelt. Nach enzymatischer und/oder chemischer Hydrolyse der Proteine werden die entstandenen Peptide, die Teilsequenzen der ursprünglichen Polypeptidkette darstellen, getrennt und identifiziert. Neben der CE wird dabei vorwiegend die mikro-RP-HPLC als Trennverfahren für die Peptidfragmente genutzt.

Darüberhinaus wird die CE zunehmend auch für die physikochemische Charakterisierung von Peptiden genutzt, wie zum Beispiel zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes, der Dissoziationskonstanten, des Diffusionskoeffizienten, der Sekundärstruktur (bei Polypeptiden) und der Assoziationskonstanten von Peptiden mit verschiedenen Liganden [63].

In Abhängigkeit von der Anzahl, der Sequenz und den physikochemischen Eigenschaften der verknüpften Aminosäuren unterscheiden sich Peptide in ihrer elektrischen Ladung, Größe, Form (Konformation), Hydrophobizität, und ihren Bindungseigenschaften gegenüber verschiedenen Additiven. Diese Eigenschaften erlauben eine Trennung durch die verschiedenen CE-Verfahren basierend auf Unterschieden in der Mobilität (CZE, ITP), der Größe (CGE), der Ladung (CIEF), der Hydrophobizität (MEKC, ECC), und den Bindungseigenschaften zu anderen Molekülen (Bioaffinitätskapillarelektrophorese oder CE unter Verwendung pseudostationärer Phasen, wie z.B. Cyclodextrinen).

Das wichtigste CE-Verfahren zur Trennung von Peptiden ist die CZE. Die elektrophoretische Mobilität eines Peptides wird dabei hauptsächlich durch dessen Ladung, Größe und Form bestimmt. Peptide sind amphotere Substanzen, da sie sowohl saure als auch basische Funktionalitäten enthalten. Carboxylgruppen am C-Terminus und/oder in der Seitenkette saurer Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) ermöglichen die Migration zur Anode (anodische Mobilität), während Aminogruppen am N-Terminus und/oder in der Seitenkette basischer Aminosäuren (Lysin, Arginin, Histidin) eine Protonierung und dadurch kathodische Mobilität (als Kationen) ermöglichen. Der Ladungszustand eines solchen Ampholyten, und damit dessen Mobilität, ist sehr stark vom pH-Wert des Puffers abhängig und lässt sich bei Kenntnis der  $pK_a$ -Werte mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnen. So berechnet sich beispielsweise die Ladung einer monovalenten protonierten Base nach:

$$z = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pKa}}} \quad (9).$$

Um nun Vorhersagen über das elektrophoretische Verhalten von Peptiden treffen zu können, wurde die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der Ladung ( $z$ ) und der Größe (molare Masse,  $M_r$ ) eines Peptides umfassend untersucht. Auf Grundlage der Offord-Gleichung [65]

$$\mu = \text{const} \frac{z}{M_r^{2/3}} \quad (10)$$

wurde eine Vielzahl semiempirischer Modelle entwickelt [66]. Beispielsweise ergab sich für eine Gruppe von 18 Standardpeptiden die beste Korrelation zwischen berechneten und experimentell ermittelten Daten für die Darstellung der Mobilität über  $q/M^{0.56}$  [67]. Der Einfluss der Konformation auf die Mobilität konnte durch eine Abweichung von diesem linearen Zusammenhang nachgewiesen werden. Polypeptide, die bevorzugt eine  $\alpha$ -Helix- oder eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ausbilden, zeigen im Vergleich zu denen, die vorwiegend als statistisches Knäuel (*random coil*) vorliegen, signifikante Abweichungen in ihrem elektrophoretischen Verhalten [68]. Ein weiterer Faktor, der zu einer Abweichung vom linearen Zusammenhang zwischen Mobilität ( $\mu$ ) und Peptidladung ( $z$ ) führt, ist die Ladungsverteilung im Peptid. Terminale Ladungen beeinflussen die Mobilität anders als Ladungen innerhalb der Peptidkette. Andererseits verursachen mehrere isolierten Ladungen eine andere Mobilität im Vergleich zur gleichen Zahl räumlich eng benachbarter Ladungen [69, 70]. Diese Unterschiede können mit einem ladungsinduzierten volumetrischen Effekt (*charged induced volumetric effect*) erklärt werden. Gleichartige Ladungen, die in der Peptidkette eng benachbart sind, stoßen sich gegenseitig ab und bedingen eine voluminösere Analytstruktur. Infolgedessen verursacht eine höhere Ladungsdichte einen größeren Reibungswiderstand und damit eine verringerte Mobilität.

Ein wichtiges Problem bei der CE-Trennung größerer Polypeptide ist die Adsorption an die Kapillarwand, welche zu Bandenverbreiterung und damit zu einer Verminderung der Bodenzahl führt. Außerdem kommt es bei wiederholter Injektion zu Trends in den Migrationszeiten, was auf eine Veränderung der elektroosmotischen Mobilität zurückzuführen ist. Es gibt verschiedene Strategien, solche Adsorptionsphänomene zu unterdrücken [71]. Zum einen kann die Trennung im stark sauren Milieu durchgeführt werden, was die Dissoziation der Silanolgruppen zurückdrängt und elektrostatische Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen Peptid verhindert. Zum anderen kann es durch eine Trennung im stark alkalischen Milieu zu Abstoßungskräften zwischen negativ geladenem Peptid und negativ geladener Kapillarwand kommen. Die Analyse bei diesen extremen pH-Werten ist allerdings problematisch, da Stabilitätsprobleme auftreten können und eine Trennoptimierung über den pH-Wert nicht mehr ausführbar ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der permanenten oder dynamischen Belegung der Kapillaroberfläche (vgl. Abschnitt 2.1.2). Durch den Zusatz kationischer Additive (niedermolekulare Alkylamine oder polymere Basen) oder neutraler Polymere (Cellulosederivate und Polyvinylalkohol) zum CE-Puffer kann die negative Ladung der Kapillarwand kompensiert bzw. überdeckt werden [16]. Als permanentes *Coating*-Material kommen

vor allem hydrophile Polymere wie Polyacrylamid, Polyvinylalkohol oder Polyethylenglycol zum Einsatz, die irreversibel an die Kapillarwand adsorbieren.

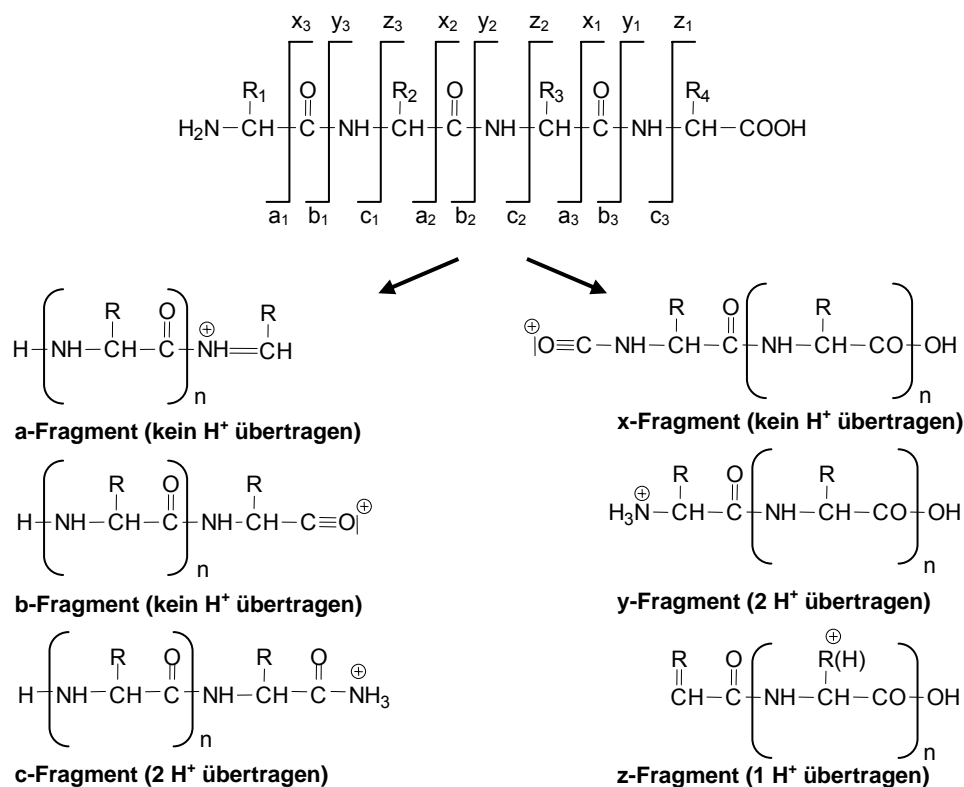
Aufgrund der relativ starken Absorption der Peptidbindung im kurzwelligen UV-Bereich wird die UV-Detektion zwischen 200 und 220 nm sehr häufig genutzt, wobei das erreichbare Detektionslimit im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich liegt. Die Bestimmung von Peptiden in Biomatrizes erfordert allerdings häufig eine deutlich höhere Empfindlichkeit. Einerseits kann durch eine Probenanreicherung bei der Injektion (*sample stacking*) die aufgegebene Probenmenge deutlich erhöht werden [72]. Andererseits können empfindlichere Detektionsverfahren wie LIF-, MS- oder elektrochemische Detektion genutzt werden. Die LIF-Detektion von Peptiden ist in einer Vielzahl von Applikationen beschrieben und ermöglicht die quantitative Bestimmung von Peptiden bis in den unteren nM-Bereich [30]. Diesem Vorteil steht jedoch die Notwendigkeit zur Derivatisierung mit geeigneten Fluorophoren (*fluorescence label*) gegenüber, da die meisten Peptide keine Eigenfluoreszenz zeigen. Auch die MS-Detektion ermöglicht hochempfindliche Bestimmungen von Peptiden im unteren nM-Bereich (entspricht bei der Injektion weniger nl einer Stoffmenge  $< 1 \text{ fmol}$ ) [73]. Diese hohe Empfindlichkeit, die Möglichkeit der genauen Bestimmung des Molekulargewichts und der Gewinn an strukturellen Informationen aus Tandem MS Messungen machen CE-MS-Kopplungen zu einem idealen Instrument der Peptid- und Proteom-analytik. Im Hinblick auf die Entwicklung empfindlicher Detektionsverfahren stellt die elektrochemische Detektion von Peptiden eine weitere Alternative dar.

Im Folgenden werden die Möglichkeiten der Peptidsequenzierung mittels ESI-MS-Detektion und der elektrochemischen Detektion von Peptiden dargestellt, da sowohl CE-ESI-MS als auch CE-ED in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden.

### 2.3.1 Sequenzierung von Peptiden mit ESI-MS

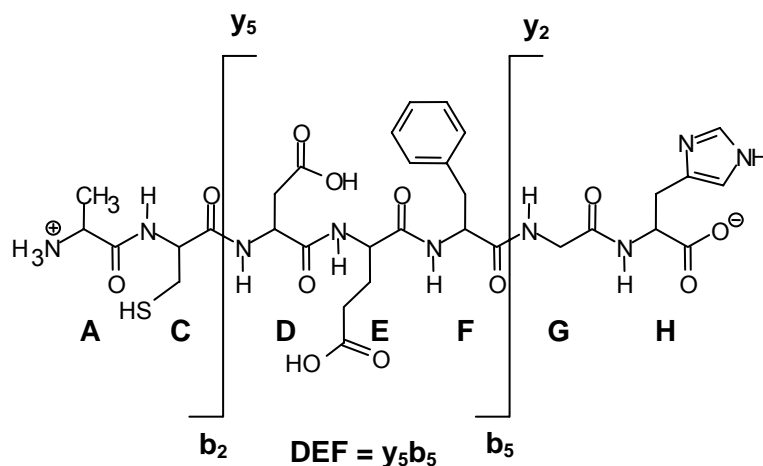
Zur Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie nutzt man vor allem Tandem-MS und  $\text{MS}^n$ -Techniken. Durch eine Interpretation des beobachteten Fragmentierungsmusters kann auf die Peptidsequenz geschlossen werden. Die Fragmentierung tritt hauptsächlich an den Peptidbindungen entlang der Peptidkette auf. Insgesamt gibt es drei verschiedene Möglichkeiten der Spaltung: vor dem Carbonylkohlenstoff der Amidbindung, in der Amidbindung oder nach dem Amid-Stickstoff (Abbildung 6). Verbleibt bei der Spaltung die Ladung an den Fragmenten der N-terminalen Serie, so werden die entsprechenden Fragmente mit a, b, c indiziert, verbleibt die Ladung dagegen an den Fragmenten der C-terminalen Serie, werden sie mit x, y, z bezeichnet. Ein zusätzlicher Index gibt die Zahl der in dem Fragment-Ion enthaltenen Aminosäurereste an. Diese Nomenklatur wurde 1984 von Roepstorff und Fohlmann [74] eingeführt. Die Spaltung eines doppelt geladenen Peptid-Ions führt normalerweise zur Bildung eines b-Fragment-Ions und des korrespondierenden y-Ions. Da meist die Amidbindung bricht, wird am häufigsten die Entstehung von b- und y-Ionenserien beobachtet. Einfach geladene Vorläufer-Ionen können dagegen nur ein geladenes Fragment-Ion und ein Neutrlfragment bilden, das im Massenspektrum nicht registriert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung von internen Fragment-Ionen, die vorwiegend in  $\text{MS}^n$ -Experimenten zur Strukturidentifizierung herangezogen werden können. Dabei kommt es zu einer



**Abbildung 6.** Schema der Fragmentierung von Peptiden (Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlmann [74]). Zusätzlich zum Bindungsbruch übertragene Wasserstoffatome sind angegeben.

zweiten Spaltung der zuvor gebildeten (zumeist y- oder b-) Fragment-Ionen. Die dabei entstehenden Ionen enthalten weder den N- noch den C-Terminus des ursprünglichen Mutter-Peptids und werden daher als interne Fragmente bezeichnet. Die Nomenklatur interner Fragmente soll kurz an einem Beispiel erläutert werden (Abbildung 7). Das Heptapeptid mit der Sequenz ACDEFGH (Aminosäure-Reste im Ein-Buchstaben-Code) bildet ein b<sub>2</sub>/y<sub>5</sub>-Fragmenten-Paar nach der ersten Spaltung zwischen den Aminosäureresten C und D. Das entstehende b<sub>2</sub>-Fragment enthält die Reste AC und



**Abbildung 7.** Nomenklatur für die Bezeichnung interner Peptidfragmente am Beispiel des Heptapeptides ACDEFGH (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code).

das  $y_5$ -Fragment die Reste DEFGH. Die Spaltung des  $y_5$ -Ions zwischen F und G führt zur Bildung von zwei Fragmenten, welche die Reste DEF bzw. GH enthalten. Letzteres ist das reguläre  $y_2$ -Fragment. Hingegen ist das interne Fragment-Ion DEF weder ein  $y$ - noch ein  $b$ -Fragment des Mutterpeptides und wird als  $y_5b_5$ -Ion bezeichnet. Umgekehrt würde die Spaltung des  $b_5$ -Fragments zwischen C und D das  $b_2$ -Ion und das interne Fragment-Ion mit der Bezeichnung  $b_5y_5$  liefern.

### 2.3.2 Elektrochemische Detektion von Peptiden

Im Vergleich zur UV-Detektion zeigt die elektrochemische Detektion von Peptiden Vorteile bezüglich Empfindlichkeit und Selektivität. Amperometrische Verfahren spielen bei CE-ED-Kopplungen zur Peptidanalytik die größte Rolle, aber auch der Einsatz konduktometrischer [75] und potentiometrischer Detektoren [76] wurde beschrieben.

Voraussetzung für eine direkte amperometrische Detektion von Peptiden an einer Kohle- oder Platinelektrode ist das Vorhandensein elektrochemisch aktiver Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin oder Cystein. So ist beispielsweise die CE-ED-Bestimmung von Met- und Leu-Enkephalin unter Verwendung von Kohlefaserelektroden beschrieben [77, 78]. Cystein-enhaltende Peptide können an verschiedenen Elektrodenmaterialien oxidiert werden. Amalgamierte Goldelektroden finden dabei verbreitet Anwendung, da es an diesem Elektrodenmaterial in Gegenwart von Thiolen zur katalytischen Oxidation des Quecksilbers kommt, was zu einer höheren Empfindlichkeit und einer verbesserten Selektivität führt [79]. Viele CE-ED-Applikationen beschäftigen sich daher mit der Trennung der biologisch aktiven Peptide Glutathion und Glutathiondisulfid [42, 43, 80, 81]. Durch die Verwendung von Kupferelektroden können auch elektrochemisch inaktive Peptide erfasst werden, da es in stark alkalischer Lösung (50-100 mM NaOH-Lösung) an diesen Elektroden zu einer elektrokatalytischen Oxidation der Peptide kommt [82, 83].

Eine weitere Strategie, elektrochemisch inaktive Peptide der CE-ED-Analyse zugänglich zu machen, ist die Derivatisierung mit leicht oxidierbaren Reagenzien. Das wichtigste Derivatisierungsverfahren ist die Bildung des Peptid-Kupfer(II)-Komplexes (Biuret-Komplex) unter alkalischen Bedingungen. An der Detektionselektrode kommt es zur Oxidation des Kupfer(II)-Komplexes unter Bildung von Kupfer(III)-Ionen. So konnten mit Hilfe ihrer Biuret-Komplexe elektrochemisch inaktive Enkephalin-Fragmente [84] und verschiedene Angiotensin-Peptide [85] an Kohlelektroden detektiert werden. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode liegt im Vergleich zur Verwendung von Kupferelektroden um etwa eine Zehnerpotenz niedriger. Die Vorsäulenderivatisierung mit Naphthalen-2,3-dicarboxyaldehyd [86] und p-Nitrophenol-2,5-dihydroxyphenylacetat-bis-tetrahydropyranyl-ether [87] wurde ebenfalls erfolgreich zur CE-ED-Bestimmung elektrochemisch inaktiver Peptide genutzt.

## 2.4 Bestimmung physikochemischer Parameter

Neben der Trennung von Substanzen können mit Hilfe der verschiedenen CE-Verfahren auch physikochemische Eigenschaften der Analyten bestimmt werden, u.a. Dissoziationskonstanten, isoelektrische Punkte, Bindungskonstanten, Diffusionskoeffizienten und Stokesche Radien [88]. Bei Proteinen und Polypeptiden ist außerdem ein Wechsel der Sekundärstruktur durch eine Veränderung des Migrationsverhaltens zu erkennen [89]. Der große Vorteil der Bestimmung von physikochemischen Parametern mit der CE liegt darin begründet, dass nur sehr geringe Substanzmengen benötigt werden und dass mehrere Substanzen parallel bestimmt werden können. Im Folgenden werden die Grundlagen der Bestimmung von Dissoziationskonstanten mit Hilfe der CZE erläutert, wobei verstärkt auf die Besonderheiten bei Peptiden eingegangen werden soll.

### 2.4.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die elektrophoretische Mobilität einer schwachen Säure oder Base ist vom pH-Wert abhängig. Aus diesem Grund ist es möglich, Dissoziationskonstanten ( $pK_a$ -Werte) mit Hilfe der CE zu bestimmen. In den letzten Jahren hat die Bedeutung dieses Verfahrens zur  $pK_a$ -Wert-Bestimmung stark zugenommen, da die CE gegenüber anderen Verfahren, wie der potentiometrischen Titration, der RP-HPLC und der UV-Spektroskopie, einige Vorteile bietet [90, 91]. Aufgrund der sehr geringen Analytkonzentrationen, die für die CE-Analyse benötigt werden, ist auch eine  $pK_a$ -Wert-Bestimmung von schwer löslichen Analyten möglich. Außerdem ist es möglich Substanzen geringer Reinheit zu untersuchen, da die Verunreinigungen vom Zielanalyten abgetrennt werden können. Die mittels CE bestimmten  $pK_a$ -Werte liegen in der Regel im Bereich von  $\pm 0.2$   $pK_a$ -Einheiten der Literaturwerte und haben eine Präzision von 0.07  $pK_a$ -Einheiten [91].

Prinzipiell muss man bei der  $pK_a$ -Wert Bestimmung zwischen Neutralsäuren (HA) und Kationensäuren bzw. protonierten Basen ( $HB^+$ ) unterscheiden, da im ersten Fall die deprotonierte ( $A^-$ ) und im zweiten Fall die protonierte Form ( $HB^+$ ) die migrierende Spezies darstellen. Die Dissoziationskonstante einer Neutralsäure ( $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$ ) ist definiert als:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (11)$$

bzw. in der gebräuchlichen logarithmischen Form:

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (12).$$

In der CE wird die effektive Mobilität ( $\mu_{\text{eff}}$ ) dazu genutzt, die elektrophoretische Gesamtmobilität aller miteinander im Gleichgewicht stehenden ionischen Spezies einer Verbindung zu charakterisieren, wobei die Einstellung dieses dynamischen Gleichgewichts deutlich schneller erfolgt als die

elektrophoretische Trennung. In diesem Fall resultiert ein Einzelpeak für alle Spezies, die im entsprechenden Elektrolytssystem vorliegen. Für eine monovalente Säure HA bedeutet dies, dass  $\mu_{\text{eff}}$  entsprechend der Formel

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha \mu_{\text{act}} \quad (13)$$

vom Dissoziationsgrad ( $\alpha$ ) und der elektrophoretischen Mobilität der vollständig deprotonierten Säure (*actual mobility*,  $\mu_{\text{act}}$ ) abhängig ist. Der Dissoziationsgrad, der das Verhältnis der Anzahl dissoziierter Moleküle ( $A^-$ ) zur Gesamtzahl der Moleküle ( $HA + A^-$ ) angibt, kann nach Umformen der Gleichung 12 folgendermaßen berechnet werden:

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (14).$$

Ersetzt man nun  $\alpha$  in Gleichung 13 durch den Wert aus Gleichung 14, ergibt sich der Zusammenhang zwischen effektiver Mobilität und der Dissoziationskonstante zu:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{act}}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (15).$$

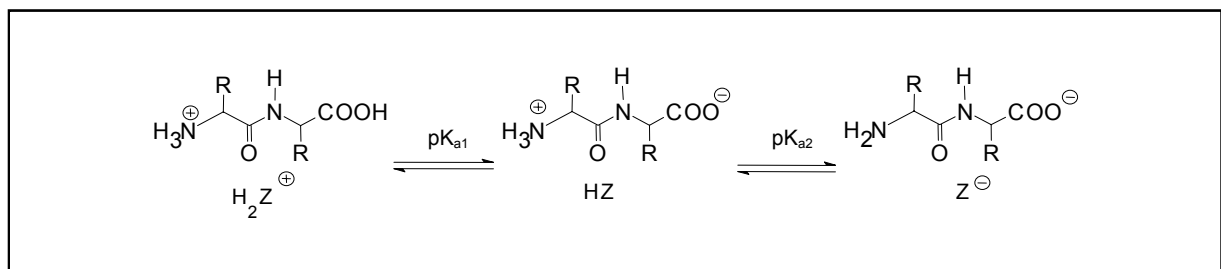
Da bei einer Kationensäure ( $HB^+ \leftrightarrow H^+ + B$ ) die protonierte Spezies in der CE migriert, berechnet sich die effektive Mobilität nach folgender Gleichung:

$$\mu_{\text{eff}} = (1 - \alpha) \mu_{\text{act}} \quad (16)$$

und damit gilt für die Berechnung der Dissoziationskonstanten:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{act}}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \quad (17).$$

Das Dissoziationsverhalten eines neutralen Peptides ist in Abbildung 8 dargestellt. Peptide als amphiprotische Substanzen können in Abhängigkeit vom pH-Wert sowohl als Kation ( $H_2Z^+$ ) als auch



**Abbildung 8.** Dissoziationsverhalten eines Dipeptides. Rest R ohne weitere dissoziierbare Gruppe.

als Anion ( $Z^-$ ) in der CE migrieren. Die zwitterionische Spezies ist nach außen ungeladen und wird durch den EOF durch die Kapillare transportiert. Die effektive Mobilität errechnet sich nach:

$$\mu_{\text{eff}} = (1 - \alpha_{\text{H}_2\text{Z}^+}) \mu_{\text{H}_2\text{Z}^+} + \alpha_{\text{HZ}} \mu_{\text{Z}^-} \quad (18)$$

wobei  $\mu_{\text{H}_2\text{Z}^+}$  und  $\mu_{\text{Z}^-}$  die Mobilität der vollständig protonierten bzw. deprotonierten Form darstellen. In Analogie zu den Gleichungen 15 und 17 können die Dissoziationskonstanten  $\text{pK}_{\text{a}1}$  und  $\text{pK}_{\text{a}2}$  eines solchen neutralen Peptides auf Grundlage folgender Gleichung berechnet werden:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{H}_2\text{Z}^+}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a}1})}} + \frac{\mu_{\text{Z}^-}}{1 + 10^{(\text{pK}_{\text{a}2} - \text{pH})}} \quad (19).$$

Sind am Aufbau der Peptidkette saure oder basische Aminosäuren beteiligt, müssen weitere Terme in die Gleichung eingeführt werden [91, 92]. Die Berechnung der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte erfolgt durch eine nichtlineare Kurvenanpassung einer Serie von  $\mu_{\text{eff}}$ -Werten, die bei verschiedenen pH-Werten gemessen wurden.



## 2.5 Verwendung nichtwässriger Lösungsmittel in der Kapillarelektrophorese

In der CE werden fast ausschließlich rein wässrige Elektrolytlösungen verwendet. Die Zugabe organischer Lösungsmittel kann als zusätzlicher Optimierungsparameter genutzt werden. Bei Verwendung geeigneter Puffersysteme können auch nichtwässrige Systeme zur Anwendung kommen. Die ersten kapillarelektrophoretischen Untersuchungen in organischen Lösungsmitteln wurden 1984 von Waldbroehl und Jorgenson zur Trennung von Chinolinbasen in auf Acetonitril basierenden Puffern beschrieben [6]. In den folgenden Jahren wurden organische Lösungsmittel in der CE jedoch ausschließlich als so genannte *organic modifier* meist in Konzentrationen bis 40% (v/v) eingesetzt. Erst 1994 wurde von Sahota und Kahledi erneut von CE-Untersuchungen im nichtwässrigen Milieu berichtet [93]. Bis heute stieg die Anzahl an Publikationen zur nichtwässrigen Kapillarelektrophorese (*nonaqueous capillary electrophoresis*, NACE) stetig an und liegt jetzt bei etwa 40-60 pro Jahr [7, 94]. Die Gründe für diese rasante Entwicklung sollen im Folgenden aufgezeigt werden.

Die NACE erweitert die Anwendbarkeit der CE bereits im Hinblick auf die Löslichkeit der Analyten. Die größten Vorteile des Einsatzes organischer Lösungsmittel in der CE ergeben sich jedoch durch ein deutlich erweitertes Spektrum physikochemischer Parameter wie Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) und Viskosität ( $\eta$ ), sowie die Effekte auf das Säure-Base-Verhalten und die Solvatisierung der Analyten. Diese Eigenschaften wirken sich entscheidend auf die Analytmobilität aus, da sie sowohl die effektive Ladung eines Ions als auch dessen hydrodynamischen Radius beeinflussen. Durch das Mischen verschiedener Lösungsmittel können diese Eigenschaften variiert und analytische Parameter wie Auflösung, Analysenzeit und Selektivität optimiert werden. Darüberhinaus ermöglichen organische Lösungsmittel Trennungen, die überwiegend auf hydrophilen Wechselwirkungen beruhen. Diese Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Ion-Dipol-, Dipol-Dipol und ionischen Wechselwirkungen sind in Lösungsmitteln mit kleiner Dielektrizitätszahl thermodynamisch begünstigt [95]. Neben diesen trennmethologischen Aspekten bieten organische Lösungsmittel auch Vorteile für die ESI-MS [96] und die elektrochemische Detektion [97] in Bezug auf Empfindlichkeit und Anwendungsmöglichkeiten. Porras und Kenndler schlussfolgern in einem aktuellen Übersichtsartikel [94], der sich sehr kritisch mit häufig behaupteten „generellen Vorteilen“ der NACE bezüglich Selektivität, Trenneffizienz, Analytlöslichkeit und -stabilität auseinandersetzt, dass der deutlichste Vorteil der NACE gegenüber der wässrigen CE die erhöhte Analytstabilität in nichtwässrigen Lösungsmitteln ist. Allerdings gehen die Autoren nicht auf Aspekte der Detektion, den Einsatz verschiedener Additive und die Trennung spezieller Substanzgruppen ein, sondern beschränken sich auf grundsätzliche Betrachtungen.

### 2.5.1 Anforderungen an nichtwässrige Lösungsmittel

Eine geschickte Wahl des Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches ist für das Gelingen der CE-Trennung im nichtwässrigen Modus entscheidend. Nicht jedes organische Lösungsmittel ist als Trennmedium für die CE geeignet. Prinzipiell müssen organische Lösungsmittel, die in der CE Anwendung finden sollen, folgende Anforderungen erfüllen:

- gute Lösungseigenschaften für die Analyten und die Puffersubstanzen,
- relativ hohe Dielektrizitätszahl ( $\epsilon$ ),
- relativ niedrige Viskosität ( $\eta$ ),
- geringer Dampfdruck,
- chemische Stabilität, geringe Toxizität und
- kommerziell in hoher Reinheit erhältlich.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Lösungsmittel und deren für die CE relevanten Eigenschaften zusammengestellt. Die Dielektrizitätskonstante ist ein wichtiger Parameter für die CE, da die Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen im Wesentlichen durch diese Lösungsmiteleeigenschaft bestimmt wird. Die potenzielle Energie einer ionischen Wechselwirkung berechnet sich nach:

$$E_p = \frac{z_A z_B e^2}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon r} \quad (20)$$

wobei  $z_A$  und  $z_B$  die Ladungen der Ionen A und B,  $e$  die Elementarladung,  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante und  $r$  den Abstand beider Ionen voneinander darstellen. Die meisten der in der NACE genutzten Lösungsmittel haben eine Dielektrizitätskonstante von  $\epsilon > 30$ . Dadurch wird eine ausreichend hohe ionische Dissoziation der Elektrolyte ermöglicht. Für elektrophoretische Untersuchungen ist es essentiell, dass der Elektrolyt dissoziiert vorliegt, da der Trennpuffer im Hochspannungsfeld als Stromleiter fungieren soll und erst dadurch ein robustes und kontinuierliches System entstehen kann. Bei Lösungsmitteln mit Werten für  $\epsilon < 30$  ist die Dissoziation der Elektrolyte nur schwach ausgeprägt und die Ionenpaarbildung dominiert. Wie man aus Gleichung 5 ableiten kann, sollten die verwendeten Lösungsmittel eine geringe dynamische Viskosität aufweisen, um eine hohe Analytmobilität und damit kurze Analysenzeiten zu ermöglichen.

**Tabelle 1.** *Eigenschaften einiger CE-relevanter Lösungsmittel bei 25°C [98].*

	Klasse nach Brønsted	$\epsilon$	$\eta$	$\epsilon/\eta$	$pK_{\text{auto}}$	$\gamma$	$\mu$	UV cut-off
Wasser	neutral amphiprotisch	78.4	0.89	88.1	17.5	71.8	1.85	190
Methanol	neutral amphiprotisch	32.7	0.55	59.5	16.9	22.3	2.87	211
Ethanol	neutral amphiprotisch	24.6	1.08	22.8	19.1	21.9	1.66	211
1-Propanol	neutral amphiprotisch	20.5	1.94	10.6	19.4	23.1	3.09	211
2-Propanol	neutral amphiprotisch	19.9	2.04	9.6	21.8	21.2	1.66	211
Formamid	basisch amphiprotisch	109.5	3.30	33.2	16.8	58.2	3.37	272
N-Methylformamid	basisch amphiprotisch	182.4	1.65	110.5	10.7	39.5	3.86	273
Acetonitril	dipolar aprotisch	35.9	0.34	105.6	32.2	28.3	3.92	191
Dimethylformamid	dipolar aprotisch	36.7	0.80	45.9	23.1	36.4	3.82	272
Dimethylsulfoxid	dipolar aprotisch	46.5	1.99	23.4	31.8	43.0	4.06	275

Einheiten: Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  (dimensionslos); Oberflächenspannung  $\gamma$  in mN·m; dynamische Viskosität  $\eta$  in cP; Dipolmoment  $\mu$  in D ( $1D = 3.33564 \cdot 10^{-30}$  Cm); Autoprotolysekonstante  $pK_{\text{auto}}$  (dimensionslos); UV-cut-off = „mind. 50% UV-Transparenz ab“ in nm.

Der Einfluss des Lösungsmittels auf den EOF kann im Wesentlichen von der Smoluchowski-Gleichung (Gleichung 6) abgeleitet werden. Danach wird die elektroosmotische Mobilität hauptsächlich durch das  $\epsilon/\eta$ -Verhältnis bestimmt. Beispielsweise zeigen systematische Untersuchungen zum Effekt des Lösungsmittels auf den EOF deutlich, dass man in auf Acetonitril basierenden Puffern sowohl im alkalischen als auch im sauren Milieu die größte elektroosmotische Mobilität bei den untersuchten organischen Lösungsmitteln erhält [99]. Allerdings zeigt diese Studie auch, dass die verschiedenen Säure-Base-Eigenschaften der Lösungsmittel die Protolyse der Silanolgruppen und damit das Zetapotenzial beeinflussen, was die Vorhersage des EOF in der NACE erschwert.

Die Einteilung nach den Protolyseeigenschaften der Lösungsmittel erfolgt in Anlehnung an die Theorie nach Brønsted. Danach wird zwischen amphiprotischen und dipolar aprotischen Lösungsmitteln unterschieden. Ein Lösungsmittel (SH) zeigt amphiprotische Eigenschaften, wenn es eine meßbare Autoprotolyse ( $2 \text{ SH} \leftrightarrow \text{SH}_2^+ + \text{S}^-$ ) zeigt. Lösungsmittel dieser Klasse wie Wasser, Methanol (MeOH) und Formamid (FA) können über Wasserstoffbrückenbindungen stark untereinander wechselwirken und sind in der Lage sowohl Protonen aufzunehmen als auch abzugeben. Dipolar aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril (ACN), Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) können hingegen nur Protonen aufnehmen und zeigen keine meßbare Autoprotolyse ( $\text{pK}_{\text{auto}} > 20$ ).

Eine weitere wichtige Größe für die Anwendbarkeit eines Lösungsmittels in der NACE ist die UV-Transparenz, da die meisten Geräte mit einem UV-Detektor ausgestattet sind. Die verschiedenen Alkanole und Acetonitril können bei Detektionswellenlängen unter 215 nm eingesetzt werden, hingegen sind bei den Amiden und Dimethylsulfoxid höhere Detektionswellenlängen nötig. Aufgrund ihrer günstigen physikochemischen Eigenschaften sind Methanol, Acetonitril und Mischungen dieser beiden Lösungsmittel die mit Abstand am häufigsten genutzten Lösungsmittel in der NACE [7].

### 2.5.2 pH-Wert im nichtwässrigen Milieu

Im Gegensatz zu wässrigen Systemen ist die Bestimmung des pH-Wertes im nichtwässrigen Milieu sehr problematisch [100]. Da die potentiometrische Bestimmung des pH-Wertes in nichtwässrigen Lösungsmitteln schwierig ist, wird in den meisten NACE-Veröffentlichungen nur die Zusammensetzung des CE-Puffers angegeben und auf eine Angabe des pH-Wertes verzichtet. Einige Autoren geben auch den so genannten scheinbaren pH-Wert (*apparent pH*,  $\text{pH}_{\text{app}}$ ) an, der mit Hilfe einer Glaselektrode gemessen wird, die eine wässrige Referenzelektrolytlösung enthält und gegen wässrige Pufferlösungen kalibriert wurde. Die mit dieser Methode gemessenen  $\text{pH}_{\text{app}}$ -Werte weichen jedoch sehr stark vom thermodynamischen pH-Wert ( $-\log a_{\text{H}^+}$ ) ab. Andererseits ermöglicht sie in einfacher Weise eine Abschätzung relativer Aziditätsverhältnisse im nichtwässrigen Milieu unter der Voraussetzung, dass die Lösungsmittelzusammensetzung konstant gehalten wird. Hauptproblem bei potentiometrischen pH-Messungen im nichtwässrigen Milieu ist das unbekannte Flüssigkeitsgrenzschichtpotenzial (*liquid junction potential*), das zwischen nichtwässriger Prüflösung und wässrigem Innenelektrolyt der Referenzelektrode auftritt. Die Verwendung einer Glaselektrode mit nichtwässrigem Innenelektrolyt in Kombination mit der Verwendung nichtwässriger Kalibrierpuffer ist daher die genaueste Methode zur pH-Wert-Bestimmung im nichtwässrigen Milieu. Allerdings wurde

diese Methode bisher nicht zur Charakterisierung von NACE-Puffern genutzt, da die Erhaltung der Elektrodenfunktion bei diesen Glaselektroden sehr aufwendig ist [100].

Eine Alternative zur potentiometrischen Bestimmung des pH-Wertes ist die Verwendung nicht-wässriger Standardpuffer. Der pH-Wert wird in diesem Fall über das Mengenverhältnis einer Standardsäure (mit bekanntem  $pK_a$ -Wert im entsprechenden Lösungsmittel) zu seinem Salz über die Handerson-Hasselbalch-Gleichung bestimmt. Porras *et al.* etablierten anhand dieses Konzeptes die so genannte *conventional pH scale* ( $pH_{conv}$  oder  $pH^*$ ) für methanolische Puffersysteme [101, 102]. Verschiedene organische Säuren wie z.B. Essigsäure ( $pK_a^* = 9.7$ ), Bernsteinsäure ( $pK_{a2}^* = 11.5$ ) oder Dichloressigsäure ( $pK_a^* = 6.3$ ), deren *conventional  $pK_a$  values* ( $pK_a^*$ ) aus der Literatur bekannt waren, bildeten dabei die Grundlage für diese pH-Skala.

### 2.5.3 Selektivität

In diesem Abschnitt soll anhand einiger Beispiele das Potenzial der NACE in Bezug auf eine verbesserte Selektivität bzw. Anwendbarkeit gegenüber der herkömmlichen wässrigen CE beschrieben werden.

Die CE-Trennung neutraler Analyten in wässrigem Milieu erfolgt meist mit Hilfe der MEKC. Allerdings ist die Trennung sehr hydrophober Analyten schwierig, da die Mizellbildung bei einem erhöhten Gehalt an organischem Lösungsmittel im MEKC-Puffer ausbleibt. Durch die verstärkten Ion-Dipol-Wechselwirkungen in nichtwässrigen Lösungsmitteln können neutrale Analyten mit einer Ladung versehen und im elektrischen Feld getrennt werden. So wurden beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAH) mit Hilfe planarer organischer Kationen wie Tropylium-Ionen und 2,4,6-Triphenylpyrylium-Ionen in Acetonitril getrennt [103]. Die positive Ladung des Additivs induziert die Bildung eines Dipols, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen ermöglicht werden. Da die Polarisierbarkeit der PAH von der Anzahl der Ringe abhängig ist, kann die Komplexstabilität und damit die elektrophoretische Mobilität der Molekülgröße zugeordnet werden.

Die Vorteile der NACE für die Analyse von wasserunlöslichen synthetischen Polymeren konnten anhand der Trennung verschiedener Polymerisierungsstufen des Polypeptids Poly( $N_\epsilon$ -trifluoroacetyl-L-lysin) gezeigt werden [9]. Neben der Basislinientrennung der Polypeptide (bis zu einem Polymerisationsgrad von 50) ermöglicht die NACE-Analyse außerdem Aussagen über die Konformation des Polymers.

Die Trennung von Phenol und eng verwandten Methyl-substituierten Derivaten (o-, m- und p-Kresol) ist aufgrund ihrer sehr ähnlichen  $pK_a$ -Werte mit Hilfe der wässrigen CE nicht möglich. Die Trennung von o-Kresol ( $pK_a = 10.28$ ) und p-Kresol ( $pK_a = 10.26$ ) ist besonders schwierig, da beide nahezu identische Dissoziationskonstanten aufweisen [104]. Durch die Verwendung methanolischer Pufferlösungen wurde eine Trennung dieser schwachen Säuren möglich [102]. Die Autoren erklären den Selektivitätsvorteil der NACE für dieses Trennproblem mit verschiedenen stark ausgeprägten  $pK_a$ -shifts dieser Analyten beim Wechsel von Wasser zu Methanol (o-Kresol:  $pK_a^* = 14.78$ ; p-Kresol:  $pK_a^* = 14.54$ ).

Die Trennung von Enantiomeren ist eines der wichtigsten Anwendungsgebiete kapillarelektrophoretischer Trennverfahren [105, 106]. Im Gegensatz zur wässrigen CE, bei der chirale Trennungen überwiegend auf der Bildung von Cyclodextrin-Einschlußverbindungen beruhen, werden in der NACE vorwiegend Ion-Ion- oder Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Analyt und chiraalem Selektor genutzt [107, 108]. Die Bildung diastereomerer Ionenpaare zwischen positiv geladenen Chininderivaten und negativ geladenen chiralen Analyten ist die wichtigste Wechselwirkung, die für chirale NACE-Trennungen genutzt wird. Lindner und Mitarbeiter konnten mit Hilfe von tert.-Butylcarbamoyl-chinin als chiraalem Selektor in Ethanol/Methanol (60:40, v/v) verschiedene N-geschützte Dinitrobenzoyl(DNB)-Aminosäuren und DNB-Alanin-Peptide in ihre Enantiomere trennen [8, 109].

#### 2.5.4 Detektion in der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese

Die UV-Detektion ist auch bei der NACE das wichtigste Detektionsverfahren. Allerdings sei an dieser Stelle noch einmal auf die geringe UV-Transparenz einiger Lösungsmittel (DMSO, DMF, FA) bei niedrigen Wellenlängen hingewiesen, was beispielsweise die Detektion von Peptiden ohne aromatische Aminosäuren in diesen Lösungsmitteln unmöglich macht (vgl. Abschnitt 2.5.1). Aufgrund der geringeren Leitfähigkeit der meisten nichtwässrigen Puffersysteme ist es im Gegensatz zur wässrigen CE möglich, Kapillaren mit einem größeren Innendurchmesser (bis 320 µm) zu verwenden, ohne dass es zu einer starken Jouleschen Aufheizung der Kapillare kommt. Durch die Vergrößerung der Detektionsschichtdicke kann die UV-Detektionsempfindlichkeit ohne Verlust an Trenneffizienz erhöht werden [110].

In verschiedenen Studien konnte eine verbesserte Empfindlichkeit der LIF-Detektion bei der NACE beobachtet werden [111, 112]. Die erhöhte Fluoreszenzaktivität der Analyten in den nichtwässrigen Puffern ist mit der erhöhten Viskosität bzw. der verringerten Polarität der organischen Lösungsmittel erklärbar.

Auch elektrochemische Detektionsverfahren (vgl. Abschnitt 2.2.2) finden bei der NACE ihre Anwendung, wobei vorwiegend amperometrische Methoden zum Einsatz kommen [97, 112]. Acetonitril und Acetonitril/Methanol-Mischungen sind dabei die Lösungsmittel der Wahl. Im Vergleich zu wässrigen Lösungen ist der Potenzialbereich für die amperometrische Detektion in diesen Lösungsmitteln deutlich erhöht. So können beispielsweise in trockenem Acetonitril Detektionspotenziale zwischen -3 und +3 V an der Arbeitselektrode angelegt werden, während in Wasser der Potenzialbereich von -1 bis +1 V begrenzt ist. Analyten, die in wässriger Lösung nicht detektierbar sind, können daher mittels NACE-ED bestimmt werden. Durch die geringen elektrophoretischen Ströme bei der Verwendung nichtwässriger Elektrolytsysteme (< 5 µA) wird der Einfluss des Hochspannungsfeldes auf die elektrochemische Detektion stark verringert. Dadurch ist es möglich, Kapillaren mit einem Innendurchmesser bis 75 µm ohne Einsatz eines Entkopplers zu verwenden [97]. Außerdem können nichtwässrige Lösungsmittel die Reproduzierbarkeit der Detektion deutlich erhöhen, da unerwünschte Ablagerungen von Redox-Produkten an der Oberfläche der Arbeitselektrode aufgrund des verbesserten Lösungsvermögens leichter entfernt werden. NACE-ED-Applikationen wurden bisher für die Bestimmung von Cannabinoiden in Haarproben [113], Nicotin und

verwandten Alkaloiden in Tabakproben [114], Hydrazin und verschiedenen Methylhydrazinderivaten in Umweltproben [115] und Amphetamin-artigen Drogen [116] beschrieben. Aufgrund der hohen Detektionsempfindlichkeit der NACE-ED konnten alle Analyten bei den aufgeführten Anwendungen im Spurenbereich erfasst werden.

In verschiedenen Übersichtsartikeln wird auf die Vorteile der NACE für die ESI-MS-Detektion hingewiesen [7, 112, 117]. Die leichte Verdampfbarkeit und die geringe Oberflächenspannung organischer Lösungsmittel begünstigen die Ionisierung im Elektrospray und führen zu besseren Detektionsgrenzen im Vergleich zur wässrigen CE. Auch bei der NACE-ESI-MS werden vorwiegend Methanol und Acetonitril als Lösungsmittel genutzt. Systematische Untersuchungen zur NACE-ESI-MS haben allerdings gezeigt, dass die Empfindlichkeitsvorteile durch die Verwendung von ACN und MeOH gegenüber Wasser nur sehr gering ausgeprägt sind [96]. Hauptmotivation für die Verwendung nichtwässriger Lösungsmittel in der CE-MS-Kopplung sind daher hauptsächlich trennmethologische Vorteile der NACE.

### 3 Übersicht zu den Manuskripten

In der folgenden Sammlung von fünf Manuskripten, die nach thematischen Gesichtspunkten aufgeführt sind, werden trennmethodische Grundlagen und verschiedene Anwendungen für den Einsatz der NACE zur Analytik von Peptiden beschrieben. Dafür wurde der Einfluss nichtwässriger Lösungsmittel auf das Dissoziationsverhalten (Manuskript 1) und die Sekundärstruktur (Manuskript 2) von Peptiden untersucht, welche das Migrationsverhalten in der Kapillarelektrophorese entscheidend bestimmen. Selektivitätsvorteile durch den Einsatz nichtwässriger Lösungsmittel in der Kapillarelektrophorese von Peptiden standen dabei im Vordergrund. Die hohe Trennleistung der NACE und deren verbesserte Kompatibilität mit verschiedenen Detektionsverfahren werden in drei weiteren Manuskripten dargestellt. So wurde die Kopplung der NACE mit der ESI-MS-Detektion zur Charakterisierung des mikroheterogenen Peptaibol-Peptidgemisches Alamethicin F30 genutzt (Manuskript 3 und 4). Eine weitere Applikation nutzt die Vorteile der NACE für die elektrochemische Detektion zur Bestimmung von Enkephalin-Peptiden (Manuskript 5).

Bei allen vorliegenden Manuskripten habe ich folgende Aufgaben selbst durchgeführt: (1) Organisation, Ausführung und Bewertung der CE-UV-, CD- (Manuskript 2), CE-ESI-MS- (Manuskript 3 und 4), CE-ED- und CBIA-ED-Messungen (Manuskript 5), (2) Synthese von Modellpeptiden (Manuskript 3), (3) Optimierung SPE Methode (Manuskript 5) und (4) Erstellung der Manuskripte. Die quantitative Auswertung der CD-Spektren mit Hilfe des CDPro Programmes (Manuskript 2) wurde von S. Feuerstein unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Willbold, Institut für Physikalische Biologie im Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt. Die CE-ESI-MS-Messungen (Manuskript 3 und 4) erfolgten bei der Firma Bruker Daltonics in Leipzig unter Betreuung von Dr. C. Neusüß und Dr. M. Pelzing. Das mittels NACE-ESI-MS untersuchte Peptaibolgemisch Alamethicin F30 wurde von Herrn Prof. Dr. H. Brückner, Institut für Ernährungswissenschaften, Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ), Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Literaturrecherche zum Vorkommen von Pyroglutamyl-Peptiden in der belebten Natur und die HPLC-MS-Untersuchungen zur Bestätigung des Vorkommens von Pyroglutamyl-Peptiden im untersuchten Alamethicin F30 (Manuskript 3) wurde von Dr. T. Degenkolb, Institut für Ernährungswissenschaften, Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ), Universität Gießen, durchgeführt. Die NACE-ED- und CBIA-ED-Messungen wurden am Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig, unter Betreuung von Herrn PD Dr. F.-M. Matysik durchgeführt.

#### Manuskript 1

Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: Comparison of methanol and aqueous buffers

A. Psurek, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2003, 24, 765-773.

In dieser Studie wurde der Effekt von Methanol auf das Dissoziationsverhalten verschiedener kleiner Peptide untersucht. Das Dissoziationsverhalten bestimmt entscheidend den Ladungszustand des Analyten und damit dessen elektrophoretische Mobilität. Diese Untersuchungen waren daher

grundlegend für das Verständnis des Migrationsverhaltens von Peptiden in methanolhaltigen Trennpuffern. Mit Hilfe der CE unter Verwendung definierter Puffersysteme wurden die  $pK_a$ -Werte von isomeren Aspartyl-Dipeptiden, Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin in Methanol, Methanol/Wasser (1:1, v/v) und Wasser bestimmt. Der Wechsel von Wasser zu Methanol als Lösungsmittel führt zu einem Anstieg der  $pK_a$ -Werte, wobei dieser Anstieg für die Carboxylfunktion stärker ausgeprägt ist als für die Aminogruppe. Die Studie zeigt weiterhin, dass die NACE gegenüber der wässrigen CE Vorteile für die Trennung der Enkephalin-Peptide bei höheren pH-Werten bietet.

## Manuskript 2

Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of  $\alpha$ -helical polypeptides - effect of secondary structure on separation selectivity

A. Psurek, S. Feuerstein, D. Willbold, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis*, in Überarbeitung (Datum der Aufforderung zur Überarbeitung: 04.10.2005).

Die Mobilität wird neben der Ladung des Analyt-Ions vorwiegend durch dessen sphärische Ausdehnung bestimmt. Bei Polypeptiden, die aus mehr als 12-14 Aminosäuren aufgebaut sind kann es daher zu Mobilitätsunterschieden aufgrund verschiedener Sekundärstrukturen kommen. In dieser Studie wurde die Trennung amphiphiler  $\alpha$ -helikaler Peptide mittels wässriger CE und NACE verglichen. Veränderungen in der Sekundärstruktur der Polypeptide wurden mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Durch die Verwendung nichtwässriger Trennpuffer konnten für diese Peptide deutliche Selektivitätsverbesserungen erreicht werden, die mit einer Stabilisierung der Sekundärstruktur im nichtwässrigen Milieu erklärbar sind. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wurde das Migrationsverhalten kleiner Peptide, die keine definierte Sekundärstruktur ausbilden können, in wässrigen und nichtwässrigen Trennpuffern untersucht. Dabei wurden im Vergleich zu den Polypeptiden deutlich geringere Effekte auf die Selektivität bei Verwendung der verschiedenen Lösungsmittel beobachtet.

## Manuskript 3

Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry

A. Psurek, C. Neusüß, E. Balaguer, D. Imhof, T. Degenkolb, H. Brückner, G. K. E. Scriba, *Journal of Peptide Science*, im Druck (Datum der Annahmebestätigung: 25.07.2005).

Das mikroheterogene Peptaibolgemisch Alamethicin F30 wurde mittels NACE-ESI-IT-MS und NACE-ESI-TOF-MS untersucht. Die verbesserte Trennung amphiphiler  $\alpha$ -helikaler Peptide in nichtwässrigen Puffern im Vergleich zu wässrigen Puffern und die gute Kompatibilität der NACE mit der ESI-MS-Detektion bildeten die Grundlage für diese Studie. Alamethicin F30 wurde aus dem Schimmelpilz *Trichoderma viride* Strang NRRL 3199 isoliert und besteht vorwiegend aus linearen Peptiden, die zumeist aus 20 Aminosäuren aufgebaut sind. Mit Hilfe der NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup> ( $n = 1-3$ ) konnten



insgesamt elf verschiedene Peptide identifiziert werden, die sich vor allem durch einen Aminosäureaustausch in den Positionen 6, 7 und 19 auszeichnen. Zusätzlich wurden zwei aus 14 Aminosäuren bestehende Pyroglutamyl-Peptide identifiziert, die Rumpfsequenzen der Hauptkomponente darstellen.

#### **Manuskript 4**

Analysis of the lipophilic peptaibol alamethicin by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry

A. Psurek, C. Neusüß, M. Pelzing, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2005, 26, 4368-4378.

In der vorliegenden Studie wurden vorwiegend methodische Aspekte der NACE-ESI-MS Kopplung zur Bestimmung des Peptaibolgemisches Alamethicin F30 untersucht. Die Bildung von Mono-, Di- und Triammoniumaddukten mit den zwei- und dreifach geladenen Molekül-Ionen konnte mittels ESI-TOF-MS-Messungen bestätigt werden. Die hohe Massengenauigkeit und die Auflösung des Isotopenmusters durch den TOF-Massenanalysator ermöglichte eine Verifizierung der mittels ESI-IT-MS identifizierten Peptide. Trennmethodisch war hier vor allem die Migration zweier ungeladener Peptaibole interessant, die mit Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und den Puffer-Ionen erklärbar ist. Das beobachtete Migrationsverhalten konnte mit Hilfe von Modellpeptiden bestätigt werden. Ein Vergleich der NACE-Ergebnisse mit einer HPLC-ESI-MS-Untersuchung des Alamethicin F30 zeigte, dass die Trennung der Komponenten, die zwei Carboxylfunktionen besitzen, besser mit der CE-Methode gelingt, während die Komponenten mit nur einer Carboxylfunktion besser mit der HPLC erfasst werden können.

#### **Manuskript 5**

Determination of enkephalin peptides by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection

A. Psurek, F.-M. Matysik, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis*, zur Publikation angenommen (Datum der Annahmebestätigung: 31.08.2005).

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes nichtwässriger Lösungsmittel in der CE ist die verbesserte Kompatibilität mit elektrochemischen Detektionsverfahren. In der vorliegenden Applikation wurde ein NACE-ED-System zur Bestimmung von Enkephalin-Peptiden genutzt. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene nichtwässrige Puffersysteme und PEG-beschichtete Kapillaren zur Optimierung der Trennung genutzt. Das elektrochemische Verhalten der untersuchten Peptide wurde mit Hilfe der CBIA-Technik untersucht. Die Bestimmungsgrenzen der NACE-ED-Methode liegen im sub- $\mu\text{M}$  Bereich und damit etwa eine Zehnerpotenz niedriger als mit der UV-Detektion. Die Bestimmung von Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin in gespickten Plasmaproben nach SPE-Aufreinigung zeigt die praktische Anwendbarkeit der entwickelten NACE-ED-Methode.

## **4      Manuskripte**

### **4.1      Manuskript 1**

Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: Comparison of methanol and aqueous buffers

A. Psurek, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2003, 24, 765-773.

Arndt Psurek  
Gerhard K. E. Scriba

University of Jena, School  
of Pharmacy, Department of  
Pharmaceutical Chemistry,  
Jena, Germany

## Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: Comparison of methanol and aqueous buffers

Nonaqueous capillary electrophoresis was evaluated for its potential to separate peptides in methanolic background electrolytes in comparison to aqueous-methanol (50% v/v) and water. Isomeric aspartyl dipeptides and Leu- and Met-enkephalin served as model compounds.  $pK_a$  values were determined in the three solvent systems based on the apparent pH scale and in the case of methanol additionally based on the conventional pH scale. Changing from water to methanol led to an increase of the ionization constants describing the dissociation equilibria of the carboxyl group and the amino group, respectively. The  $pK_a$  shift was more pronounced for the carboxylic acid function leading to a compression of the mobility-pH curve. As reported for aqueous buffers, efficient separations of the peptides were achieved in methanolic background electrolytes including the resolution of the diastereomers of the isomeric  $\alpha$ - and  $\beta$ -aspartyl dipeptides. In contrast to aqueous buffers, the separation of Leu- and Met-enkephalin could also be obtained in buffers in methanol at high pH.

**Keywords:** Dissociation constant / Nonaqueous capillary electrophoresis / Peptide EL 5313

### 1 Introduction

Synthetic and natural peptides as well as peptidomimetics comprise a significant portion of the currently used pharmaceutical drugs. Highly efficient separation techniques are required for their determination in quality control or bioanalysis. In recent years, capillary electrophoresis (CE) has been recognized as a fast and simple analytical technique for the analysis of peptides including stereoisomers [1, 2]. Traditionally, aqueous buffer solutions have been used as background electrolytes in CE. However, many studies have shown that water may be replaced by organic solvents. Compared to aqueous media, nonaqueous solvents offer a wider range of dielectric constants, polarity, viscosity and autoprotolysis constants. Due to the high efficiency and selectivity, nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) has evolved as an interesting alternative to aqueous CE for the separation of closely related compounds [3–5]. Additional advantages of NACE is the better compatibility with mass spectrometry [6, 7] and electrochemical detection [8, 9]. For both detection modes lower detection limits have been reported compared to CE using aqueous buf-

fers [10]. Therefore, the application of nonaqueous solvents in CE represents an attractive approach for pharmaceutical and biomedical analysis [11–14].

Peptides as hydrophilic compounds are primarily analyzed using aqueous buffers with organic solvents serving as run buffer additives [1, 2]. Only few studies of peptide analysis in organic solvents have been described. Hansen and co-workers [15] separated Ala-Phe diastereomers using ammonium acetate-acetic acid in a 1:1 mixture of methanol and acetonitrile. Gramicidin S and bacitracin were analyzed by NACE-MS in a background electrolyte consisting of ammonium acetate and formic acid in mixtures of acetonitrile and methanol [6]. Czerwenka *et al.* [16] reported the enantiomer separation of *N*-protected alanine peptides containing up to six amino acid residues using *tert*.-butylcarbamoylequinine as chiral counterion in mixtures of methanol and ethanol. This system also allowed the separation of all four possible stereoisomers of the *N*-acyl-Ala-Ala.

The electrophoretic migration behavior in CE strongly depends on the protolysis of the analytes in the background electrolyte as described by the  $pK_a$  value of the solutes. However, acid-base equilibria of compounds in water and in nonaqueous solvents are very different. Porras *et al.* [17] investigated systematically the  $pK_a$  values of different monoacidic bases in methanol as compared to water establishing a conventional pH scale in addition to the frequently used apparent pH values of buffers in organic solvents. Another effect of the organic solvent is the modification of the actual mobility (the

**Correspondence:** Professor Gerhard K. E. Scriba, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany  
**E-mail:** gerhard.scriba@uni-jena.de  
**Fax:** +49-3641-949802

**Abbreviation:** NACE, nonaqueous capillary electrophoresis

mobility of the fully charged species) depending on the different viscosity ( $\eta$ ) and dielectric constant ( $\epsilon$ ) of the solvent [18].

The present study was conducted in order to investigate the dissociation behavior of peptides in nonaqueous solvents as compared to water and a 1:1 mixture of methanol and water. The  $pK_a$  values were determined based on the conventional pH scale as established by Porras *et al.* [17] as well as based on the apparent pH of the background electrolytes. The diastereomeric aspartyl peptide derivatives  $\alpha$ -DL-Asp-L-PheOMe and  $\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe as well as the neuropeptides Met-enkephalin and Leu-enkephalin were used as model compounds.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Leu-enkephalin, Met-enkephalin,  $\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe and  $\beta$ -L-Asp-L-PheOMe were purchased from Bachem (Heidelberg, Germany). The diastereomeric pairs  $\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe/ $\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe and  $\beta$ -L-Asp-L-PheOMe/ $\beta$ -D-Asp-L-PheOMe were prepared from Z-D/L-Asp and L-PheOMe according to Yang *et al.* [19]. Methanol (HPLC grade), acetic acid, chloroacetic acid, dichloroacetic acid, sodium chloroacetate, sodium acetate, ammonium acetate, boric acid, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), hydrochloric acid (36%), sodium hydroxide and 30% sodium methylate in methanol were from VWR

(Darmstadt, Germany). Sodium trichloroacetate and potassium dichloroacetate were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All buffer reagents were of the highest grade of purity commercially available.

### 2.2 Electrolyte solutions

Buffers were prepared by mixing the appropriate amounts of the acid and the corresponding sodium salt in the respective solvents as summarized for methanol in Table 1. Conventional pH was calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation as described by Porras *et al.* [17]. Electrolyte solutions in the acidic pH range in methanol-water and water were prepared as outlined for pure methanol in Table 1. Note that the two highest conventional pH values are out of the buffering range of the acetic acid (conventional  $pK_a = 9.7$ ). Alkaline buffers in methanol-water and water were prepared by adjusting 25 mM Tris to the appropriate pH by addition of 6 M hydrochloric acid or by adjusting 25 mM boric acid solution by the addition of 1 M sodium hydroxide. The buffer solutions were filtered through a 0.47  $\mu$ m filter and degassed by sonication prior to use. All solutions were prepared freshly on a daily basis. All freshly prepared buffers contained less than 0.025% w/w of water determined by Karl Fischer titration. The water content of the BGEs determined after the electrophoretic measurements did not exceed 0.05% w/w. pH measurements were performed with a inoLab Cond Level 1 potentiometer (WTW, Weilheim, Germany), equipped with a Schott electrode

**Table 1.** Electrolyte composition of the background electrolytes in methanol

Buffer component 1	Buffer component 2	pH <sub>app</sub> <sup>a)</sup>	pH <sub>conv</sub> <sup>b)</sup>
25.0 mM Trichloroacetic acid	25.0 mM Sodium trichloroacetate	2.2	4.9
2.5 mM Trichloroacetic acid	25.0 mM Sodium trichloroacetate	3.2	5.9
125.3 mM Chloroacetic acid	25.0 mM Sodium chloroacetate	4.4	7.1
25.0 mM Chloroacetic acid	25.0 mM Sodium chloroacetate	5.1	7.8
6.3 mM Chloroacetic acid	25.0 mM Sodium chloroacetate	5.7	8.4
125.0 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	6.3	9.0
25.0 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	7.0	9.7
7.9 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	7.5	10.2
5.0 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	7.6	10.4
3.1 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	7.9	10.6
0.8 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	8.4	11.2
0.1 mM Acetic acid	25.0 mM Sodium acetate	9.0	12.0
25.0 mM Boric acid	adjusted to pH <sub>app</sub> with 1 M NaOH in MeOH	9.9	–
25.0 mM Boric acid	adjusted to pH <sub>app</sub> with 1 M NaOH in MeOH	10.3	–
25.0 mM Ammonium acetate	25.0 mM Sodium methylate	11.3	–
15.0 mM Ammonium acetate	35.0 mM Sodium methylate	12.2	–
5.0 mM Ammonium acetate	45.0 mM Sodium methylate	12.5	–

a) Apparent pH scale, see Section 3.2

b) Conventional pH scale, see Section 3.2

N6180. The electrode was calibrated using aqueous standard pH solutions. The water content of the buffers was measured by Karl Fischer titration using 701 KF Titrino (Metrohm, Herisau, Switzerland).

## 2.3 Capillary electrophoresis

All experiments were performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument equipped with a diode-array detector (Beckman Coulter, Unterschleißheim, Germany) at 25°C using 50  $\mu\text{m}$  ID fused-silica capillaries with an effective length of 30 cm and a total length of 37 cm. UV detection was carried out at 215 nm. Sample solutions (100  $\mu\text{g/mL}$  peptide dissolved in the respective solvent) were introduced at a pressure of 3447.4 Pa for 3 s (0.5 psi). Experiments were conducted under normal polarity, applying a voltage of 25 kV (detection at the cathodic end) or under reversed polarity, applying a voltage of –25 kV (detection at the anodic end) when the electroosmotic flow was too weak. New capillaries were rinsed for 5 min with 1 M aqueous sodium hydroxide, 10 min with water and 5 min with methanol followed by the separation medium for 10 min. Between the analyses the capillary was rinsed for 2 min with methanol and 3 min with the running buffer. Analyte mobility was calculated as the difference between the apparent mobility of each peptide and the mobility of mesityl oxide used as neutral marker. Calculation of the dissociation constants was performed by nonlinear fitting of the experimental data using the program Origin 5.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Determination of the $\text{pK}_a$ values of the peptides

CE is a precise and convenient technique for the determination of  $\text{pK}_a$  values [17, 20–27]. The constants are determined by simply measuring the dependence of the effective mobility of an analyte on the pH of the background electrolyte. In contrast to potentiometric measurements, the compounds do not have to be pure and mixtures of compounds and diastereomers can be analyzed simultaneously.

Figure 1 illustrates the dissociation behavior of a dipeptide. In general, we can consider a protonated species ( $\text{H}_2\text{Z}^+$ ) with cathodic mobility, a zwitterionic species (HZ) which has no charge and migrates with the electroosmotic flow, and a dissociated anionic species ( $\text{Z}^-$ ) that migrates towards the anode. An additional dissociation equilibrium will be observed if the side chain of amino acids such as Tyr, Asp, Cys, Glu, Arg, Lys or His contains ionizable groups.

The effective mobility  $\mu_e$  of the neutral acid HA is described by Eq. (1):

$$\mu_e = \mu_a \alpha \quad (1)$$

where  $\mu_a$  is the actual mobility, *i.e.*, the mobility of the fully ionized analyte, and  $\alpha$  is the degree of ionization. For a monovalent acid (HA)  $\alpha$  is given by:

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}} \quad (2)$$

Equations (1) and (2) describe the second dissociation equilibrium ( $\text{HZ}/\text{Z}^-$ ) of the peptide. The effective mobility of a cationic acid  $\text{BH}^+$ , *i.e.*, a protonated base, is given by:

$$\mu_e = \mu_b (1 - \alpha) \quad (3)$$

corresponding to the first ionization step ( $\text{H}_2\text{Z}^+/\text{HZ}$ ). Substitution of Eq. (2) into Eqs. (1) and (3) results in Eq. (4) describing the dissociation equilibria of the peptide as shown in Fig. 1:

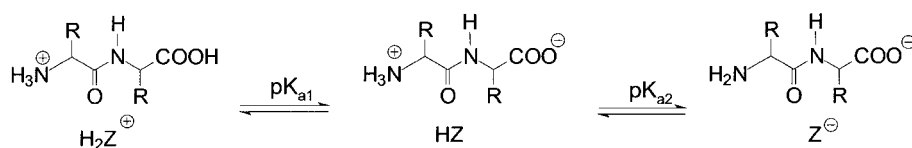
$$\mu_e = \frac{\mu_a}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}}} + \frac{\mu_b}{1 + 10^{\text{pK}_{a2} - \text{pH}}} \quad (4)$$

The dependence of the effective mobility of the peptides on the pH of the background electrolyte in water, water-methanol and methanol is summarized in Fig. 2.

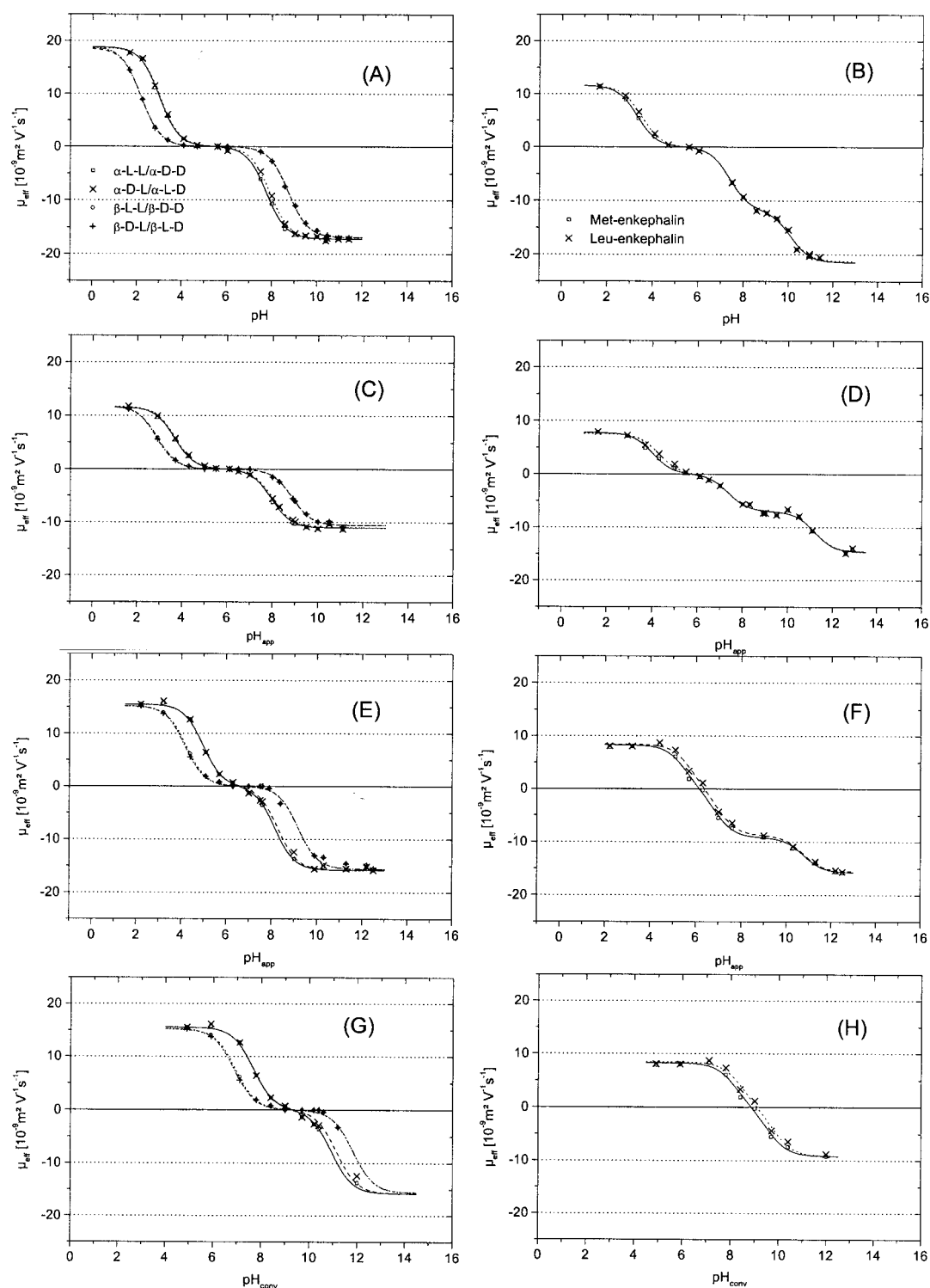
Organic solvents also influence the mobility of the fully charged species due to changes of the viscosity ( $\eta$ ) and the dielectric constant ( $\epsilon$ ). A linear increase of the ion mobility ( $\mu_{\text{ion}}$ ) with increasing  $\epsilon/\eta$  ratio can be deduced from the well-known relationship [4]:

$$\mu_{\text{ion}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon \xi_{\text{ion}}}{\eta} \quad (5)$$

where  $\epsilon_0$  is the permittivity in vacuum and  $\xi_{\text{ion}}$  is the zeta potential of the analyte ion. The viscosity of water-methanol mixtures display a maximum at about 50% methanol



**Figure 1.** Dissociation behavior of a dipeptide. Residue R without further ionizable groups.



**Figure 2.** Effective mobility of the investigated peptides as a function of the pH.  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe in (A) water, in (C) methanol-water, in (E) methanol apparent pH scale and in (G) methanol conventional pH scale; (B) Met-enkephalin and Leu-enkephalin in water, (D) in methanol-water, (F) in methanol apparent pH scale and (H) in methanol conventional pH scale. In (G) and (H) the actual mobilities of the third ionization equilibrium ( $Z^-$ ) were taken from the apparent scale pH-mobility plot (E, F). Note that for the determination of  $pK_{a3}$  (in case of the enkephalins) no conventional pH values are available. The experimental data were fitted according to Eq. (5).

resulting in a minimum of the  $\varepsilon/\eta$  ratio [28]. This reduces the analyte mobility for the water-methanol mixture resulting in a “flatter” curve as shown in Figs. 2C and D.

The ionization constants of the peptides were calculated by a nonlinear fitting of the experimental data according to Eq. (4) because this approach has been verified to give the least biased determination in comparison with other approaches [21]. For the third dissociation equilibrium of the phenolic group of tyrosine of the neuropeptides an additional term was added for the calculation of  $pK_{a3}$  similar to the second term [24]. The  $pK_a$  values obtained by curve fitting of the experimental values are summarized in Table 2. The data in methanol and methanol-water are discussed in detail below. The  $pK_a$  values of the peptides in water are in good agreement with reported data (Table 3). The present data for aqueous buffers are apparent constants because the ionic strength of the aqueous buffer solutions was not considered.

### 3.2 Dependence of $pK_a$ values on acidity scales in nonaqueous solvents

In a nonaqueous solvent the  $pK_a$  values are only valid with quantitative correlation to a suitable pH scale, because the commonly used (aqueous) pH scale has only a very limited applicability in organic solvents. Different acidity scales are classified in the literature [17, 35]. The quality of the various scales that may be defined depends on the chosen standard state and the experimental conditions of the (potentiometric) measurement of the activities of the solvated protons [35]. In general, a theoretical acidity

scale for nonaqueous solvents can be easily defined, but it is rather difficult to approximate the practically measured values to the specifications of the definition. In the present study, the conventional pH scale was used for analyses in methanol and the apparent pH scale has been applied to background electrolyte solutions in water, water methanol mixtures, and methanol.

The conventional scale can be defined by potentiometrical measurements in cells without a liquid junction potential [35]. This scale is derived from the standard scale. The problem concerning single ion activity coefficients applied to standard scale definition are circumvented by defining the activity coefficient of the chloride ion derived from the Debye-Hückel equation as standard ion in the conventional scale. Conventional pH measurements in a cell without liquid junctions are cumbersome for practical purposes. Therefore, Porras *et al.* [17] eluded problems concerning electromotive force (EMF) measurements without liquid junction by the use of solutions based on a weak acid with a defined conventional  $pK_a$  in methanol and the corresponding salt. This way, nonaqueous buffer solutions with a well-defined conventional pH were obtained, without further calibration of the pH electrodes and unknown liquid junction potentials. The resulting conventional pH values were calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation, which is valid for the weak acids used in methanol.

Standard reference buffers with defined pH values in aqueous organic media have been described [36, 37]. However, the reported values for 50% methanol only comprise pH 3.1–8.7. Therefore, only the apparent pH

**Table 2.** Ionization constants of the investigated peptides obtained in methanol, 50% v/v methanol-water mixture and water by CE

Analyte	MeOH						MeOH : water 1 : 1			Water		
	Apparent pH scale			Conventional pH scale			Apparent pH scale					
	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
$\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe	4.98 $\pm 0.04$	8.15 $\pm 0.05$	–	7.68 $\pm 0.04$	10.94 $\pm 0.06$	–	3.67 $\pm 0.04$	7.96 $\pm 0.03$	–	3.00 $\pm 0.03$	7.76 $\pm 0.02$	–
$\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe	4.98 $\pm 0.04$	8.28 $\pm 0.06$	–	7.67 $\pm 0.04$	11.15 $\pm 0.07$	–	3.70 $\pm 0.04$	8.02 $\pm 0.03$	–	3.04 $\pm 0.03$	7.92 $\pm 0.02$	–
$\beta$ -L-Asp-L-PheGMe	4.24 $\pm 0.05$	9.18 $\pm 0.07$	–	6.94 $\pm 0.05$	11.83 $\pm 0.09$	–	2.90 $\pm 0.04$	8.85 $\pm 0.03$	–	2.20 $\pm 0.04$	8.73 $\pm 0.02$	–
$\beta$ -D-Asp-L-PheOMe	4.18 $\pm 0.05$	9.18 $\pm 0.07$	–	6.88 $\pm 0.05$	11.83 $\pm 0.09$	–	2.86 $\pm 0.04$	8.87 $\pm 0.03$	–	2.18 $\pm 0.04$	8.73 $\pm 0.02$	–
Met-enkephalin	5.49 $\pm 0.11$	6.86 $\pm 0.12$	10.77 $\pm 0.22$	8.19 $\pm 0.13$	9.57 $\pm 0.11$	–	4.03 $\pm 0.10$	7.36 $\pm 0.12$	11.19 $\pm 0.13$	3.33 $\pm 0.06$	7.40 $\pm 0.07$	10.10 $\pm 0.09$
Leu-enkephalin	5.76 $\pm 0.11$	7.01 $\pm 0.13$	10.74 $\pm 0.22$	8.43 $\pm 0.12$	9.80 $\pm 0.11$	–	4.30 $\pm 0.10$	7.35 $\pm 0.12$	11.20 $\pm 0.13$	3.51 $\pm 0.06$	7.40 $\pm 0.07$	10.10 $\pm 0.09$

Calculation of the  $pK_a$  values according to Eq. (4)



**Table 3.** Aqueous  $pK_a$  values for the investigated peptides obtained by the present CZE method compared with dissociation constants reported in the literature obtained by potentiometry and CE

Analyte	$pK_{a1}$			$pK_{a2}$			$pK_{a3}$		
	Experi- mental	References		Experi- mental	References		Experi- mental	References	
		Potential- metry	CE		Potential- metry	CE		Potential- metry	CE
$\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe	3.00	3.19 [29]	3.04 [30]	7.76	7.87 [30]	7.84 [30]	–	–	–
$\beta$ -L-Asp-L-PheOMe	2.20	2.36 [30]	2.22 [30]	8.73	8.62 [30]	8.73 [30]	–	–	–
Met-enkephalin	3.33	2.28 [31]	3.22 [24]	7.40	9.11 [31]	7.26 [24]	10.10	10.11 [31]	10.05 [24]
		3.20 [32]	3.52 [34]		7.70 [32]			10.30 [32]	
		3.45 [33]			7.36 [33]			10.36 [33]	
Leu-enkephalin	3.51	2.17 [31]	3.36 [24]	7.40	9.11 [31]	7.25 [24]	10.10	10.11 [31]	10.09 [24]
		3.20 [32]	3.69 [34]		7.70 [32]			10.30 [32]	
		3.69 [33]			7.40 [33]			10.34 [33]	

scale was applied to methanol-water mixtures. For mixed aqueous-organic media deviations between the apparent  $pK_a$  and the conventional  $pK_a$  values are much lower [20], the apparent  $pK_a$  values may somewhat agree with thermodynamic  $pK_a$  data. For example, the thermodynamic  $pK_a$  values of benzoic acid in ethanol-water mixtures up to 80% ethanol show good agreement with the apparent  $pK_a$  values [20]. When comparing the pH of the reference buffers in 50% methanol with the apparent pH as measured with a commercial glass electrode calibrated with aqueous buffers, we found deviations of 0.1–0.15 pH units from the values reported in the literature [36, 37] (data now shown).

For most applications in analytical chemistry pH values based on the apparent scale are applied. For the calibration of the glass electrode aqueous standard buffers are commonly used. Compared to the conventional pH scale, the apparent pH scale leads to larger deviations from the thermodynamic pH scale [17, 35]. All scales mentioned above will lead to different pH values of identical electrolyte solutions and, thus, to different  $pK_a$  values of the analytes.

Table 2 summarizes the  $pK_a$  values obtained by curve fitting of the mobility data in the various solvent systems of Fig. 2.  $pK_{a3}$  describing the dissociation equilibrium of the phenolic group of tyrosine could not be determined in methanol using the conventional scale as this equilibrium fell outside of the pH region defined by the available standard electrolytes [17]. Changing from water to the methanol-water mixture and further to pure methanol as solvent led to an decrease of the acidity of the peptides. In accordance to studies on basic compounds [17], the apparent  $pK_a$  values in methanol were about 2.7 units lower than the data referring to the conventional pH scale (Table 2). In addition, small differences in the  $pK_a$  values of the dia-

stereomers of the isomeric aspartyl peptides were detected. Such minute differences cannot be easily observed by potentiometry [38] demonstrating the usefulness of CE for  $pK_a$  determinations.

### 3.3 $pK_a$ shift in methanol

As shown in Table 2, both  $pK_a$  values describing the dissociation equilibria of the carboxylic acid group ( $pK_{a1}$ ) and of the protonated amino group ( $pK_{a2}$ ) increase with increasing concentrations of methanol, translating to a decrease of the acidity of the respective groups. This comparison is based on the apparent scale in water and water-methanol and on the conventional scale for the data in methanol. This effect is more pronounced for  $pK_{a1}$  compared to  $pK_{a2}$ . As a result the difference between both  $pK_a$  values becomes smaller leading to a “compression” of the mobility-pH curves when increasing the concentration of methanol as can be seen in Fig. 2. The inflexion points of the curves in methanol are closer to each other compared to water. In the case of Leu- and Met-enkephalin  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  “merge” into one as no difference between the two ionization equilibria can be observed in the curve obtained for methanol (Fig. 2C). This observation is in accordance with data obtained for ampholytic quinolones in acetonitrile-water mixtures [25]. In mixtures containing high concentrations of acetonitrile where  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values were very close the two inflexion points merged into one.

The theoretical basis for the interpretation of the  $pK_a$  shift is the transfer activity coefficient model, which is based on the standard free energy change by transferring one mole of a species from water to an organic solvent. Different  $\Delta pK_a$  values for neutral acids (HA) and for cationic acids ( $HB^+$ ) are known from the literature [39–41].



The changes for protonated bases with a maximum increase of 2.7  $pK_a$  units are significantly smaller than for neutral acids which exhibit an increase of approximately 5  $pK_a$  units. This effect can be explained by a stronger stabilization of cations in methanol in contrast to anions [20]. For the investigated peptides a stronger  $pK_a$  shift of the dissociation of the carboxylic acid was observed compared to the ionization equilibrium of the protonated base.

Barbosa and co-workers [25] explained  $pK_a$  shifts observed for zwitterionic quinolones in acetonitrile-water mixtures by differences of the effect of the change of the permittivity of the medium on the dissociation process. Thus, in the case of uncharged acids which corresponds to the second ionization step of the peptides ( $HZ \leftrightarrow Z^- + H^+$ ) charges are created and electrostatic interactions become important. Consequently, the values of the corresponding dissociation constant decrease upon increasing the proportion of the organic solvent and concomitantly decreasing the polarity of the medium. In contrast, the dissociation of cationic acids ( $H_2Z^+ \leftrightarrow HZ + H^+$ , *i.e.*,  $pK_{a1}$  of the peptides) does not change the number of charges. In this case the dissociation equilibrium is primarily affected by the solvation of the different species by the solvent while the change of the permittivity of the medium is of minor importance.

The  $pK_a$  shift for the mixed aqueous organic solvent is significantly smaller than the  $pK_a$  shift in pure methanol (Table 4). A steep decrease of the  $pK_a$  values when adding a few percent of water to organic solvents has been described previously for various analytes [17, 20]. The changes for  $pK_{a1}$  ( $\Delta pK_a$  0.7–0.8  $pK_a$  units) are stronger

than for  $pK_{a2}$  ( $\Delta pK_a$  0.1–0.2  $pK_a$  units). For the second ionization step of the enkephalins no significant changes in the  $pK_a$  values were observed when changing from water to methanol-water. The observed changes are within experimental error. For  $pK_{a3}$  of the two neuropeptides a slight increase is also observed when changing from water to water-methanol. A valid comparison of the  $pK_{a3}$  values between water and methanol is impossible due to the lack of suitable conventional buffer references in this pH range.

3.4 Separation of aspartyl peptides and neuropeptides by NACE

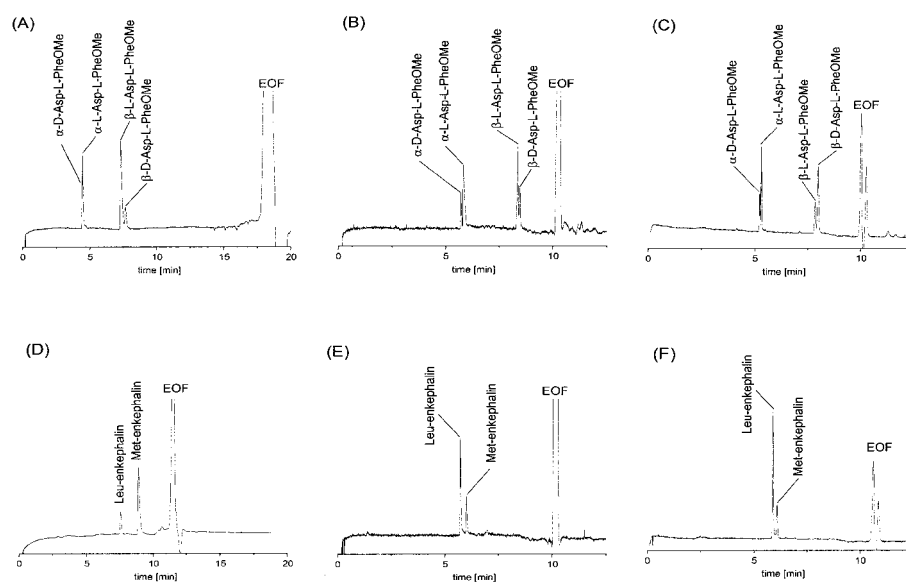
NACE can also be successfully applied to the separation of peptides. As for aqueous systems high resolution of analytes is obtained by using buffers with pH values close to the  $pK_a$  values of the peptides maximizing differences in the charge-to-mass ratio of the compounds. Figure 3 shows representative electropherograms of the diastereomers of the isomeric aspartyl peptides and the two neuropeptides under pH optimized acidic conditions using background electrolytes based on chloroacetic acid in methanol, methanol-water and water. Resolution between the neuropeptides was higher in methanol compared to the water-methanol or water while the resolution between the diastereomers of isomeric aspartyl peptides was higher when aqueous buffers were used. The best diastereomer separation in methanolic buffers was obtained using a dichloroacetate buffer at apparent pH 3.8 (Fig. 4). This buffer has not been included in the determination of the  $pK_a$  values as lower than expected electrophoretic mobility of the analytes was observed in initial experiments. This lower mobility may be due to ion pair formation as observed for basic drugs using an acetate as background electrolyte in methanol [26].

Table 4. Differences between the obtained  $pK_a$  values in the three different solvents (denoted as  $\Delta pK_a$ )

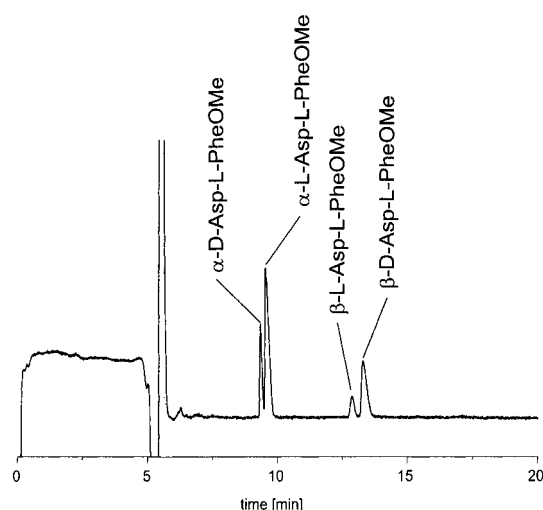
Analyte	$pK_{a1}$		$pK_{a2}$	
	$\Delta pK_{a1}$ MeOH/ water	$\Delta pK_{a1}$ MeOH-water/ water	$\Delta pK_{a2}$ MeOH/ water	$\Delta pK_{a2}$ MeOH-water/ water
$\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe	4.68	0.67	3.18	0.20
$\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe	4.63	0.66	3.23	0.10
$\beta$ -L-Asp-L-PheOMe	4.74	0.70	3.10	0.12
$\beta$ -D-Asp-L-PheOMe	4.70	0.68	3.10	0.14
Met-enkephalin	4.86	0.70	2.17	−0.04
Leu-enkephalin	4.92	0.79	2.40	−0.05

The applied methanolic  $pK_a$  values based on the conventional pH scale established by Porras *et al.* [17].  $\Delta pK_{a3}$  values of the enkephalins are only obtained between water and methanol-water (1:1), Met-enkephalin  $\Delta pK_{a3}$  = 1.09, Leu-enkephalin  $\Delta pK_{a3}$  = 1.10.

The peptides could also be separated as anionic analytes in methanolic buffers at apparent pH ( $pH_{app}$ ) 7.0 and 10.3 (Fig. 5). The separation of the diastereomers of  $\alpha$ -DL-Asp-L-PheOMe has been previously achieved in aqueous phosphate buffer, pH 8 [30]. However, the separation of Met- and Leu-enkephalin was not possible in basic aqueous buffers as also described in the literature [33] in contrast to the methanolic background electrolytes (Fig. 5B). Figure 6 illustrates the effect of the apparent pH on the resolution of Met- and Leu-enkephalin in methanol between  $pH_{app}$  2.2 and 5.7. The highest resolution  $R_s$  = 5.8 was obtained for  $pH_{app}$  5.7, which is close to the apparent  $pK_a$  values of the neuropeptides (Table 2).



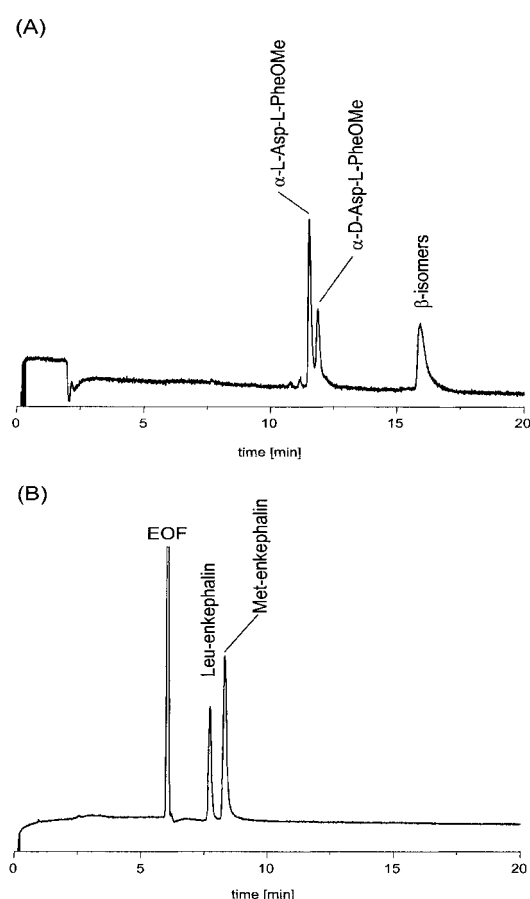
**Figure 3.** Separation of (A–C)  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe and of (D–F) the enkephalins in the acidic pH range in the three different solvent systems under optimized pH conditions. (A) 25 mM chloroacetate buffer  $pH_{app}$  4.4 in methanol, (D) 25 mM chloroacetate buffer  $pH_{app}$  5.7 in methanol, (B) and (E) 25 mM chloroacetate buffer  $pH_{app}$  3.7 in 50% v/v methanol-water, (C) and (F) 25 mM chloroacetate buffer pH 2.8 in water. Applied voltage, +25 kV.



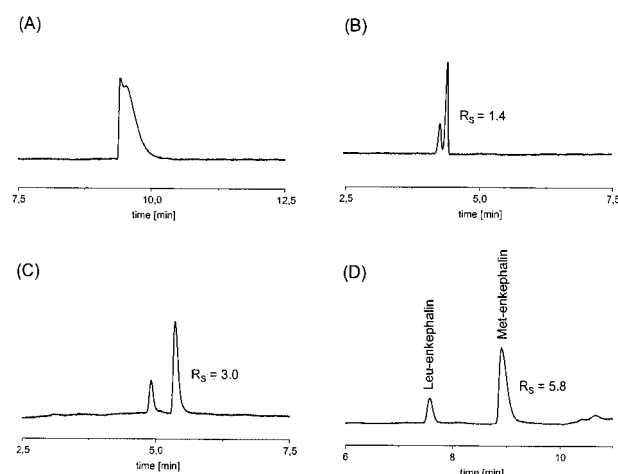
**Figure 4.** Separation of the  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe diastereomers in methanolic dichloroacetate buffer. 25 mM dichloroacetate buffer  $pH_{app}$  3.8; applied voltage, +25 kV.

#### 4 Concluding remarks

CE has been employed for the determination of the  $pK_a$  values of small peptides in methanol, methanol-water and water applying the apparent pH scale as well as the conventional pH scale in methanol. In accordance with literature data on nonpeptide analytes [17, 20, 26] a  $pK_a$  shift was observed increasing the concentration of methanol. The shift was more pronounced for  $pK_{a1}$  describing the dissociation equilibrium of the carboxyl group compared to  $pK_{a2}$  which corresponds to the ioniza-



**Figure 5.** Electropherograms of  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe and of the enkephalins obtained in methanol. (A)  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe in 28 mM borate buffer  $pH_{app}$  10.3; applied voltage, –25 kV; (B) Met- and Leu-enkephalin in 25 mM acetate buffer  $pH_{app}$  7.0; applied voltage, +25 kV.



**Figure 6.** Effect of pH on the resolution of Met- and Leu-enkephalin in methanol. (A) 25 mM trichloroacetate buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  2.2, (B) 25 mM chloroacetate buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  4.4, (C) 25 mM chloroacetate buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  5.1, (D) 25 mM acetate buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  5.7. Applied voltage, +25 kV.

tion of the amino function. The difference in the  $\text{pK}_a$  shifts when changing from water to an organic solvent may be explained by differences in the stabilization of anions and cations [20] or by differences in the charge balance during the dissociation process [25].

NACE can be effectively applied to the separation of peptides, a class of compounds that is traditionally analyzed in aqueous buffers. The analytical power of NACE is demonstrated by the separation of the structurally closely related neuropeptides Leu-enkephalin and Met-enkephalin in an alkaline methanolic background electrolyte. This separation is not possible in alkaline aqueous buffers or in methanol-water.

*The financial support by the Fonds der Chemischen Industrie is gratefully acknowledged.*

Received September 13, 2002

## 5 References

- [1] Kašička, V., *Electrophoresis* 1999, 20, 3084–3105.
- [2] Kašička, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 4139–4162.
- [3] Riekkola, M.-L., Jussila, M., Porras, S. P., Valk, I. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 155–170.
- [4] Steiner, F., Hassel, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3994–4016.
- [5] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 3–11.
- [6] Yang, Q., Benson, L. M., Kenneth, L. J., Naylor, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 103–121.
- [7] Jussila, M., Sinervo, K., Porras, S., Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 2000, 21, 3311–3317.
- [8] Matysik, F.-M., *Electrochim. Acta* 1998, 43, 3475–3482.
- [9] Matysik, F.-M., *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 349–354.
- [10] Matysik, F.-M., *Electrophoresis* 2002, 23, 400–407.
- [11] Matysik, F.-M., *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 27–34.
- [12] Cherkaoui, S., Bekkouche, K., Christen, P., Veuthey, J.-L., *J. Chromatogr. A* 2001, 922, 321–328.
- [13] Cherkaoui, S., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., *Electrophoresis* 2001, 22, 491–496.
- [14] Lu, W., Poop, G. K., Carmichael, P. L., Cole, R. B., *Anal. Chem.* 1996, 68, 668–674.
- [15] Hansen, S. H., Bjørnsdottir, I., Tjørnelund, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 49–55.
- [16] Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Electrophoresis* 2002, 23, 1887–1899.
- [17] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2001, 905, 259–268.
- [18] Chiari, M., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 303–309.
- [19] Yang, C.-P., Su, C. S., *J. Org. Chem.* 1986, 51, 5186–5191.
- [20] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 123–137.
- [21] Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 145–154.
- [22] Miller, J. L., Shea, D., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 2000, 888, 251–266.
- [23] Ishihama, Y., Oda, Y., Asakawa, N., *J. Pharm. Sci.* 1994, 83, 1500–1507.
- [24] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 4333–4340.
- [25] Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 2001, 437, 309–321.
- [26] Porras, S. P., Jyske, P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *J. Microcol. Sep.* 2001, 13, 149–155.
- [27] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *Chromatographia* 2001, 53, 290–294.
- [28] Janz, G. J., Tomkins, R. P. T., *Nonaqueous Electrolytes Handbook*, Academic Press, New York 1972, Vol. 1, pp. 102–103.
- [29] Hirokawa, T., Gojo, T., Kiso, Y., *J. Chromatogr.* 1987, 390, 201–223.
- [30] Sabah, S., *PhD Thesis*, Münster 1998.
- [31] Grossman, P. D., Colburn, J. C., Lauer, H. H., *Anal. Biochem.* 1989, 179, 28–33.
- [32] Rickard, E. C., Strohl, M. M., Nielsen, R. G., *Anal. Biochem.* 1991, 197, 197–207.
- [33] Castagnola, M., Cassiano, L., Messana, I., Nocca, G., Rabino, R., Rossetti, D. V., Giardina, B., *J. Chromatogr. B* 1994, 656, 87–97.
- [34] Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V., *J. Chromatogr. A* 1998, 823, 497–509.
- [35] Šafařík, L., Stránský, Z., *Titrimetric Analysis in Organic Solvents*, Elsevier, Amsterdam 1986, pp. 51–109.
- [36] Barbosa, J., Marques, I., Barren, D., Sanz-Nebot, V., *Trends Anal. Chem.* 1999, 18, 543–549.
- [37] Rondini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., *Pure Appl. Chem.* 1987, 59, 1549–1560.
- [38] Barbosa, J., Hernández-Cassou, S., Sanz-Nebot, V., Toro, I., *J. Peptide Res.* 1997, 50, 14–24.
- [39] Chariot, G., Trémillon, B., *Chemical Reactions in Solvents and Melts*, Pergamon Press, Oxford 1969, pp. 278–279.
- [40] Izmailov, N. A., Mozharova, T. V., *Zh. Fiz. Khim.* 1960, 34, 1709–1715.
- [41] Goldschmidt, H., Mathiesen, E., *Z. Phys. Chem.* 1926, 119, 439–473.

## 4.2 Manuskript 2

Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of  $\alpha$ -helical polypeptides – effect of secondary structure on separation selectivity

A. Psurek, S. Feuerstein, D. Willbold, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis*, in Überarbeitung (Datum der Aufforderung zur Überarbeitung: 04.10.2005).

## **Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of $\alpha$ -helical polypeptides - effect of secondary structure on separation selectivity**

Arndt Psurek<sup>1</sup>, Sophie Feuerstein<sup>2</sup>, Dieter Willbold<sup>2</sup> and Gerhard K. E. Scriba<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Jena, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany,

<sup>2</sup> Forschungszentrum Jülich, Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-2), 52425 Jülich, Germany and Heinrich-Heine-Universität, Institut für Physikalische Biologie and BMFZ, 40225 Düsseldorf, Germany.

**Running title:** Nonaqueous capillary electrophoresis of  $\alpha$ -helical peptides

### **Correspondence:**

Professor Gerhard K. E. Scriba  
School of Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
University of Jena  
Philosophenweg 14  
07743 Jena, Germany  
**E-mail:** gerhard.scriba@uni-jena.de  
**Fax:** + 49 - 3641 - 949802

**Abbreviations:** **AmpA**, ampullosporin A; **ALM F30**, alamethicin F30; **CD**, circular dichroism; **NACE**, nonaqueous capillary electrophoresis.

**Key words:** Nonaqueous capillary electrophoresis /  $\alpha$ -helical peptides / secondary structure / circular dichroism spectroscopy

## Summary

The capillary electrophoresis separation of  $\alpha$ -helical polypeptides composed of 14 – 31 amino acid residues has been investigated using aqueous and nonaqueous background electrolytes. The running buffers were optimized with respect to pH. Generally, higher separation selectivities were observed in nonaqueous electrolytes. This may be explained by a change in the secondary structure when changing from water to organic solvents. Circular dichroism spectra revealed a significant increase in helical structure in methanol-based buffers compared to aqueous buffers. In contrast, small oligopeptides of 3 – 5 amino acid residues displayed no significantly different separation selectivities under aqueous and nonaqueous conditions. Thus, the change in secondary structure of the polypeptides contributed primarily to the different separation selectivity observed in aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis.

## 1 Introduction

As hydrophilic compounds peptides can be effectively analyzed by capillary electrophoresis (CE) using aqueous background electrolytes [1, 2]. However, the successful separations of peptides by nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) employing solvents such as methanol, acetonitrile or formamide have also been reported. The advantages of nonaqueous solvents for the analysis of the lipophilic peptide antibiotics gramicidin S and bacitracin have been demonstrated [3]. The separation of enkephalin peptides as anions in the counterelectroosmotic mode could only be achieved by NACE [4, 5]. Lindner's group reported the separation of N-protected alanine peptides containing up to 6 amino acid residues in mixtures of methanol and ethanol with the aid of *tert*-butylcarbamoylquinine as chiral counter ion [6]. Generally, the application of nonaqueous media is not only suitable for the separate of solutes that are insoluble in water but also often allow the separation of solutes with very similar electrophoretic mobilities in aqueous electrolytes. The different physicochemical properties of organic solvents effect the acid-base behavior and solvation of the analytes resulting in selectivities noticeably different compared to that in aqueous media. Furthermore, organic solvents offer the potential for separation mechanisms based on interactions that can not take place or are too weak in aqueous media. Hydrophilic interactions such as hydrogen-bonding, dipole related and ionic interactions can be exploited in the hydrophobic environment in NACE, since these hydrophilic interactions are thermodynamically favored in nonaqueous media relative to aqueous media [7].

Studies on the correlation between the electrophoretic mobility of peptides and their charge and size (relative molecular mass) revealed a significant divergence from linearity of plots of mobility versus charge-to-size parameter according to several mobility models depending on the secondary structure of the peptides [8]. The "outliers" did not display random coils but rather adopted stable  $\alpha$ -helical structures under the low pH conditions applied. Florance and coworkers [9] also demonstrated the influence of the secondary structure of motilin fragments on the migration behavior in CE. Several studies have demonstrated that the addition of organic solvents to aqueous buffers leads to a stabilization of intramolecular hydrogen bonding and ionic interactions resulting in an increased structural order of the peptides. For example, Hirota et al. observed unfolding of mellitin, a major component of honeybee venom, in an aqueous environment while the addition of alcohols induces an  $\alpha$ -helical structure [10]. The  $\alpha$ -helical state was basically independent of the alcohol but the effectiveness of the alcohols varied significantly. Work by Righetti's group described the transition of the synthetic, branched-chain polymeric polypeptide poly(Lys(Glu-DL-Ala) with a 50 Lys residue backbone from random coil in water at pH 1.1 to an  $\alpha$ -helix upon the addition of methanol [11]. Reaching a 75% v/v methanol concentration the equilibrium was completely shifted towards the helical configuration. Castagnola et al. [12] have shown the advantages of the helix-inducing agent 2,2,2-trifluoroethanol for the separation of small polar peptides upon addition to aqueous buffers concluding that structuring properties of buffer additives which may not be very effective for the separation of small peptides will become a relevant factor for an improvement of separations of large apolar peptides.

The present study was conducted in order to compare the CE separation of amphiphilic  $\alpha$ -helical polypeptides in aqueous and nonaqueous background electrolytes in the context of their secondary

structure. Ampullosporin A (AmpA) analogs, the microheterogeneous alamethicin F30 (ALM F30) and the three highly basic amphiphilic peptides magainin 2, cecropin P1 and melittin were used as model compounds (Table 1).

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals

Methanol and acetonitrile (all of gradient grade quality), ammonium acetate, acetic acid, formic acid, tris(hydroxy-methyl) aminomethane (Tris), 0.1 M sodium hydroxide, sodium dihydrogen phosphate, phosphoric acid and boric acid were obtained from VWR International. Ammonium acetate was dried overnight in a desiccator over silica before use. The aqueous buffers were prepared in double distilled, deionized water. Magainin 2, cecropin P1, methionine enkephalin, leucine enkephalin, [D-Ala<sup>2</sup>] leucine enkephalin, L-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Phe, Ala-Phe-Gly, Gly-Ala-Phe, Gly-Gly-Tyr, Tyr-Gly-Gly, Gly-Leu-Tyr,  $\alpha$ -Asp-PheOMe and  $\beta$ -Asp-PheOMe were from Bachem AG (Heidelberg, Germany). Melittin and hexadimethrine bromide were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). ALM F30 was isolated from the mould *Trichoderma viride* NRRL 3199 by a method described previously [13]. The AmpA derivatives [des-Leuol] AmpA, [des-Ac] AmpA and [des-Ac-Trp<sup>1</sup>] AmpA were synthesized by solid phase synthesis according to a method described by Nguyen et al. [14] using the Fmoc strategy for the assembly of the peptide on the solid support. The peptide was purified by preparative HPLC and the identity was confirmed by MALDI-MS.

### 2.2 Apparatus and equipment

#### 2.2.1 Capillary electrophoresis

CE with UV detection was performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) equipped with a diode array detector at 25°C. UV detection was carried out at 215 nm at the cathodic end of the capillary (in case of the unmodified capillaries) or at the anodic end of the capillary (in case of the dynamically coated capillaries using the reversed polarity mode). Sample solutions were introduced by hydrodynamic injections at a pressure of 0.5 psi for 3 s.

Fused silica capillaries used for the CE experiments, 50  $\mu$ m I.D. x 360  $\mu$ m O.D., were obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). For aqueous CE analyses the capillaries were conditioned by flushing sequentially with 0.1 M sodium hydroxide for 30 min, with water for 5 min and with the electrolyte solution for 10 min. Between the aqueous CE analyses, the capillary was flushed with 0.1 M sodium hydroxide for 2 min followed by the running buffer for 2 min. For NACE experiments new capillaries were rinsed for 30 min with 0.1 M sodium hydroxide, 5 min with water and 10 min with methanol followed by the separation medium for 10 min. Between the NACE analyses, the capillary was flushed only with the running buffer for 2 min. When not in use, it was washed with the respective solvent and then dry stored. The pH and the apparent pH (pH<sub>app</sub>, in case of the nonaqueous electrolyte solutions) were measured with a WTW pMX 3000 potentiometer (WTW, Weilheim,



Germany), equipped with a Schott glass electrode N6180. The electrode was calibrated using aqueous standard pH solutions.

### 2.2.2. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were measured using a Jasco J-710 spectrometer in a rectangular quartz cell of 0.1 cm path length with a scan speed of 20 nm/min and 2 nm bandwidth at 20°C. The far UV CD spectra of the samples were recorded from 260 - 185 nm at a digital resolution of 0.1 nm. 3 scans were signal averaged for each wavelength range. The background solvent were determined in the same buffer without peptide and then subtracted. The spectra were measured with samples prepared from stock solutions of 1 mM peptide in methanol resulting in peptide concentrations of 0.1 mM in the respective electrolyte.

The mean residue ellipticity  $[\theta]$  (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) was calculated from the observed ellipticity  $\theta$  (deg) according to

$$[\theta] = \theta \cdot 100 / (c \cdot d \cdot N), \quad (1)$$

where  $c$  is the peptide concentration (mol/l),  $d$  is the path length (cm), and  $N$  is the number of the amino acid residues in the peptide. Secondary structure estimations were obtained by spectral deconvolution using the CDPPro software package [15] which consists of three programs (SELCON3, CDSSTR and CONTINLL) with a set of 56 proteins. Spectral deconvolution were analyzed in the wavelength range between 190 – 240 nm with 43 to 51 datapoints with corresponding high tension smaller than 600 V. The fractions of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet were obtained by adding the corresponding regular and distorted fractions, for example  $\alpha = H(r) + H(d)$ . The resulting data are the arithmetic means of these three programs, except for [des-Leuol] AmpA and [des-AcTrp<sup>1</sup>] AmpA in aqueous solution. In these two cases the performance of SELCON3 exceeded the 5 % range of tolerance. The resulting data for these two samples are the arithmetic means of CDSSTR and CONTINLL.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Optimization of the NACE and aqueous CE separations

Comparison of aqueous versus nonaqueous background electrolytes for CE separation of peptides was performed with the peptaibol peptides ALM F30, [des-Leuol] AmpA, [des-Ac] AmpA and [des-Ac-Trp<sup>1</sup>] AmpA, and the highly basic peptide antibiotics magainin 2, cecropin P1 and melittin (Table 1). In order to study the effect of the secondary structures on the separation selectivity small oligopeptides which do not assume well defined secondary structures were included. Methanol and methanol-acetonitrile mixtures, which are frequently used in NACE because of their favorable dielectric constant to viscosity ( $\epsilon/\eta$ ) ratio (methanol,  $\epsilon/\eta = 61 \text{ cP}^{-1}$ ; acetonitrile,  $\epsilon/\eta = 110 \text{ cP}^{-1}$ ) [16-18], were evaluated. Trifluoroethanol, which is widely used as helix-inducing solvent for peptides [19], was not investigated

due to the unfavorable physicochemical properties, e.g. high viscosity ( $\eta = 1.74$  cP at 25°C) and a low  $\epsilon/\eta$  ratio of only 15 cP<sup>-1</sup> which results in very low electrophoretic and electroosmotic mobilities. The separation conditions were optimized with regard to pH. In NACE the apparent pH was modified by changing the composition of the ammonium salt and the acid. Mixtures of ammonium acetate, ammonium trifluoroacetate as well as acetic acid and formic acid were employed. The background electrolytes which gave the best separations for the  $\alpha$ -helical polypeptides (BGE I-VI) and the small oligopeptides (BGE III, VII-XI) are listed in Table 2.

Figure 1 summarizes separations of the polypeptides under pH optimized aqueous and nonaqueous conditions. Generally, higher separation selectivities were observed in NACE. The acidic peptides ALM F30 and [desLeuol] AmpA could only be analyzed at alkaline conditions (Figure 1A and B). In NACE, acetonitrile-rich media resulted in low analyte mobilities and, therefore, no separation of the components could be achieved. This may be explained by the formation of homo- and/or heteroconjugates of the dissociated Brönsted acids commonly observed with acidic analytes in acetonitrile [20]. The analysis time in methanolic electrolytes is much longer compared to the aqueous borate buffer system due to the higher mobility of the EOF in water compared to methanol. NACE using a methanol-based background electrolyte has been superior for the analysis of minor components of ALM F30 [21].

The peptides [des-Ac] AmpA and [des-Ac-Trp<sup>1</sup>] AmpA were separated under acidic pH conditions. Compared to NACE (Figure 1C) baseline separation could not be achieved in aqueous buffer and the migration order was reversed (Figure 1D). The strongly basic peptides melittin, magainin 2 and cecropin P1 were also separated under acidic conditions. The CE analysis of melittin from other bee venom components has been performed at pH 1.8 in order to avoid adsorption of the basic peptides to the capillary wall [22]. Alternatively, polyacrylamide-coated capillaries [23] or the application of MEKC [24] have been utilized for the analysis of melittin. The use of bare fused-silica capillaries resulted in peak tailing presumably caused by wall adsorption even in nonaqueous solvents. Therefore, the analyses of these peptides were carried out in dynamically coated capillaries using 0.001% hexadimethrine bromide as EOF modifier. Hexadimethrine bromide also reverses the EOF in acetonitrile/methanol mixtures [25]. As observed for [des-Ac] AmpA and [des-Ac-Trp<sup>1</sup>] AmpA a different migration order was observed for the strongly basic peptides when changing from nonaqueous (Figure 1E) to aqueous buffers (Figure 1F). The separation selectivities for the background electrolytes resulting in the highest selectivities under aqueous and nonaqueous conditions are summarized in Table 3.

In contrast to the investigated polypeptides, CE separations of small oligopeptides with 2 – 5 amino acid residues did not demonstrate a general advantage of NACE (Figure 2) although the separations proceeded faster in methanol-based buffers. Comparable separation selectivities were observed for both CE modes (Table 3).

### 3.2 Circular dichroism spectra of the polypeptides

In order to obtain information on the secondary structure of the polypeptides, CD spectra were recorded in aqueous and nonaqueous solutions. CD is generally recognized as a suitable tool for analyzing the conformational state of peptides and proteins. Figure 3 shows the CD spectra of ALM F30 and [des-Leuol] AmpA obtained in aqueous borate buffer compared to methanolic NACE running electrolyte. Similar changes have, for example, also been observed in the CD spectrum of melittin when adding ethanol to a solution of the peptide in 20 mM aqueous hydrochloric acid [10]. Other alkanols including methanol gave similar results. The fractions of the conformation,  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn, and random coil, secondary structures in aqueous compared to nonaqueous media obtained from the CD spectra analysis are summarized in Table 4. The CD spectra of [des-Ac] AmpA and [des-AcTrp<sup>1</sup>] AmpA could not be recorded in the CE background electrolytes because of the high background absorption below 210 nm caused by the high content (0.5 M – 1.0 M) of acetic acid in the CE running buffers. Generally, an increase of the  $\alpha$ -helical content was noted when changing from aqueous to nonaqueous media. This effect is most intensely pronounced for the AmpA derivatives, which possess the lowest contents of  $\alpha$ -helix ( $\leq 7\%$ ) in the aqueous environment. The  $\alpha$ -helical structure dominates in nonaqueous electrolytes, while a larger fraction of  $\beta$ -sheet and  $\beta$ -turn conformations is observed in water. In most cases a reduction of the fraction of the random coil structure is also found in nonaqueous media. This effect can be explained by a stabilization of intramolecular hydrogen-bonds in the hydrophobic environment, which leads to conformational changes in favor of the secondary structure with the lowest conformational energy for the  $\alpha$ -helix [26]. The  $\beta$ -sheet structure also has intramolecular hydrogen bonds, but for the investigated polypeptides the conformational energy of an  $\alpha$ -helix appears to be significantly lower than that of a  $\beta$ -sheet.

### 3.3 Effect of the secondary structure on the separation selectivity in NACE compared to aqueous CE

The effect of the solvent on the selectivity coefficient is more pronounced for the  $\alpha$ -helical polypeptides (Table 3) which are able to adopt different secondary structures in water and methanol (Table 4). The stabilization of the more structured  $\alpha$ -helix conformation in nonaqueous solvents results in different Stokes radii of the analytes compared to the random coil structure in aqueous solutions. Consequently, a higher electrophoretic resolution of the peptides is achieved. On the other hand, organic solvents affect acid-base equilibria and thereby the charge of the solutes as described in several publications [4, 27, 28]. The inversion of the migration order of Gly-Gly-Tyr and Tyr-Gly-Gly in NACE compared to aqueous CE can be explained by a  $pK_a$  shift. Moreover, the acid base equilibria of ionizable groups in peptides and proteins are also affected by the secondary and higher order structures. Overall, the effect of the organic solvents on the peptide dissociation constants should be similar for polypeptides and oligopeptides. Therefore, the selectivity enhancement observed for the  $\alpha$ -helical polypeptides can be attributed, at least to a large extent, to differences in the Stokes radii of the analytes. This is caused by the different shapes and frictional drags of such peptides [8, 11]. Using large organic ions with a low charge density Kenndler and co-workers demonstrated for organic solvents that the hydrodynamic friction (Stokes law) appeared to play a major role in the retardation of

ionic movements and, i.e. also for solvent-induced selectivity changes [29]. However, additional phenomena such as changes in ion-ion interactions, homo- and heteroconjugation, changes in the solvation of the analyte ions, or differences in the dielectric frictions [30, 31] may also contribute to an improvement of polypeptide separations in organic versus aqueous background electrolytes.

#### **4 Concluding remarks**

Compared to aqueous buffers, higher separation selectivities were observed for the polypeptides when using nonaqueous background electrolytes. CD spectra recorded in the respective background electrolytes indicated an increase in the  $\alpha$ -helical structure due to the stabilization of intramolecular hydrogen bonds in the organic solvent. In contrast, no significant effect of the solvent was found for small oligopeptides which are not able to adopt different structure in an organic solvent. In addition to changes of the frictional drag caused by solvent-induced changes of the secondary structure additional phenomena such as  $pK_a$  shift of ionizable groups (induced either by the solvent or alterations of the secondary structure), ion-solvation, ion-ion interactions, etc. can contribute to the increase separation selectivity observed in the present study when substituting aqueous background electrolytes by methanol-based electrolytes. Overall, NACE appears to be an interesting alternative for the analysis of peptides when changes in the secondary structure can be induced in organic solvents.

#### **5 Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the gift of ALM F30 and AmpA derivatives by Professor Dr. H. Brückner (Institute of Nutritional Science, University of Giessen, Germany) and Dr. D. Imhof (Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Jena, Germany), respectively.

## 6 References

- [1] Kašička, V., *Electrophoresis* 1999, 20, 3084-3105.
- [2] Kašička, V., *Electrophoresis* 2003, 24, 4013-4046.
- [3] Yang, Q., Benson, L. M., Johnson, K. L., Naylor, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 103-121.
- [4] Psurek, A., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 765-773.
- [5] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 4333-4340.
- [6] Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Electrophoresis* 2002, 23, 1887-1899.
- [7] Bowser, M. T., Kranack A. R., Chen D. D. Y., *Trends Anal. Chem.* 1998, 17, 424-434.
- [8] Sitaram, B. R., Keah, H. H., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 1999, 857, 263-273.
- [9] Florance, J., Konteatis, Z. D., Macielag, M. J., Lessor, R. A., Galdes, A., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 391-399.
- [10] Hirota, N., Mizuno, K., Goto, Y., *J. Mol. Biol.* 1998, 275, 365-378.
- [11] Verzola, B., Perduca, M., Mezô, G., Hudecz, F., Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2003, 24, 794-800.
- [12] Castagnola, M., Cassiano, L., Messana, I., Paci, M., Rossetti, D. V., Giardina, B., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 271-281.
- [13] Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R. K., Brückner, H., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 799-809.
- [14] Nguyen, H.-H., Imhof, D., Kronen, M., Schlegel, B., Härtl, A., Gräfe, U., Gera, L., Reissmann, S., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2781-2787.
- [15] Sreerama, N., Woody, R. W., *Anal. Biochem.* 2000, 287, 252-260.
- [16] Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 2002, 23, 3865-3883.
- [17] Riekkola, M.-L., Jussila, M., Porras, S., Valkó, I. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 155-170.
- [18] Steiner, F., Hassel, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3994-4016.
- [19] Nelson, J. W., Kallenbach, N. R., *Biochemistry* 1989, 28, 5256-5261.
- [20] Porras, S. P., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 455-465.
- [21] A. Psurek, A., Neusüß, C., Balaguer, E., Imhof, D., Degenkolb, T., Brückner, H., Scriba, G. K. E., *J. Peptide Sci.*, 2005, in press.
- [22] Pacáková, V., Štulík, K., *J. AOAC Internat.* 2000, 83, 549-554.
- [23] Janini, G. M., Metral, C. J., Issaq, H. J., Muschik, G. M., *J. Chromatogr. A* 1999, 848, 417-433.
- [24] Mills, J. O., Holland, L. A., *Electrophoresis* 2004, 25, 1237-1242.
- [25] Tjørnelund, J., Bazzanella, A., Lochmann, H., Bächmann, K., *J. Chromatogr. A* 1998, 811, 211-217.
- [26] Kinoshita, M., Okamoto, Y., Hirata, F., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 2773-2779.
- [27] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2001, 905, 259-268.
- [28] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 123-137.
- [29] Muzikar, J., van de Goor, T., Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 375-382.
- [30] Porras, S., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1485-1498.
- [31] Huie, C. W., *Electrophoresis* 2003, 24, 1508-1529.

Table 1. Amino acid sequences and molecular masses (MM) of the investigated  $\alpha$ -helical polypeptides. Aib – aminoisobutyric acid, Pheol – phenylalaninol, Leuol – leucinol.

peptide	Amino acid sequence	MM
ALM F30 <sup>a)</sup>	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib <sup>5</sup> -Ala-Gln-Aib-Val-Aib <sup>10</sup> -Gly-Leu-Aib-Pro-Val <sup>15</sup> -Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol <sup>20</sup>	1964.3
[des-Leuol] AmpA	Ac-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu <sup>5</sup> -Aib-Gln-Aib-Aib-Aib <sup>10</sup> -Gln-Leu-Aib-Gln-OH	1540.7
[des-Ac] AmpA	H-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu <sup>5</sup> -Aib-Gln-Aib-Aib-Aib <sup>10</sup> -Gln-Leu-Aib-Gln-Leuol <sup>15</sup>	1580.5
[des-AcTrp <sup>1</sup> ] AmpA	H-Ala-Aib-Aib-Leu-Aib <sup>5</sup> -Gln-Aib-Aib-Aib-Gln <sup>10</sup> -Leu-Aib-Gln-Leu-ol	1395.9
Melittin	H-Gly-Ile-Gly-Ala-Val <sup>5</sup> -Leu-Lys-Val-Leu-Thr <sup>10</sup> -Thr-Gly-Leu-Pro-Ala <sup>15</sup> -Leu-Ile-Ser-Trp-Ile <sup>20</sup> -Lys-Arg-Lys-Arg-Gln <sup>25</sup> -Gln-NH <sub>2</sub>	2846.5
Cecropin P1	H-Ser-Trp-Leu-Ser-Lys <sup>5</sup> -Thr-Ala-Lys-Lys-Leu <sup>10</sup> -Glu-Asn-Ser-Ala-Lys <sup>15</sup> -Lys-Arg-Ile-Ser-Glu <sup>20</sup> -Gly-Ile-Ala-Ile-Ala <sup>25</sup> -Ile-Glu-Gly-Gly-Pro <sup>30</sup> -Arg-OH	3338.9
Magainin2	H-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe <sup>5</sup> -Leu-His-Ser-Ala-Lys <sup>10</sup> -Lys-Phe-Gly-Lys-Ala <sup>15</sup> -Phe-Val-Gly-Glu-Ile <sup>20</sup> -Met-Asn-Ser-OH	2846.5

<sup>a)</sup> ALM F30 posses a microheterogeneous mixture composed of the two major components ALM F30 (amino acid sequence shown) and [Aib<sup>6</sup>] ALM F30, and different minor components in concentrations ranging form 0.4 – 4.0% [13].

Table 2. Composition and pH of background electrolytes (BGEs).

BGE	electrolyte system	solvent system	pH
I	10 mM ammonium acetate	methanol	8.0 <sup>a)</sup>
II	25 mM borate buffer	water	11.0
III	25 mM ammonium acetate/1 M acetic acid	methanol	5.5 <sup>a)</sup>
IV	25 mM ammonium acetate/0.5 M acetic acid	water	3.4
V	25 mM ammonium trifluoroacetate/50 mM trifluoroacetic acid, 0.001% hexadimethrine bromide	methanol/acetonitrile (1:3, v/v)	2.3 <sup>a)</sup>
VI	25 mM ammonium acetate/250 mM acetic acid, 0.001% hexadimethrine bromide	water	3.7
VII	25 mM ammonium acetate/1 M acetic acid	methanol/acetonitrile (1:1, v/v)	5.4 <sup>a)</sup>
VIII	25 mM ammonium acetate/1 M acetic acid	methanol/acetonitrile (1:3, v/v)	5.3 <sup>a)</sup>
IX	25 mM ammonium acetate/1 M acetic acid	water	3.1
X	25 mM ammonium acetate/0.5 M formic acid	methanol/acetonitrile (1:1, v/v)	4.6 <sup>a)</sup>
XI	25 mM ammonium acetate/0.5 M formic acid	methanol/acetonitrile (1:3, v/v)	4.8 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> For organic background electrolytes the apparent pH is listed.

Table 3. Separation selectivities ( $r$ ) for the analysis of the  $\alpha$ -helical polypeptides compared to small oligopeptides obtained with the NACE and aqueous CE, respectively. For experimental conditions see Figures 1 and 2. Selectivities coefficients were calculated according to  $r = \mu_1/\mu_2$ ,  $\mu_1 > \mu_2$ , where  $\mu_1$  and  $\mu_2$  were the effective mobilities of the analytes.

	$r_{\text{NACE}}^{\text{a)}}$	BGE	$r_{\text{ACE}}^{\text{b)}}$	BGE	$r_{\text{NACE}} / r_{\text{ACE}}$
<i><math>\alpha</math>-helical polypeptides (14-31 amino acids)</i>					
[des-Leuol] AmpA / ALM F30	1.69	(I)	1.12	(II)	1.51
[des-Ac] AmpA / [des-Ac-Trp <sup>1</sup> ] AmpA	1.50	(III)	0.96	(IV)	1.56
cecropin P1 / magainin 2	1.50	(V)	0.96	(VI)	1.56
melittin / magainin 2	1.71	(V)	1.11	(VI)	1.54
melittin / cecropin P1	1.14	(V)	1.11	(VI)	1.03
<i>small oligopeptides (2-5 amino acids)</i>					
Ala-Phe LL + DD / DL + LD	1.29	(VII)	1.19	(IX)	1.08
$\alpha$ -Asp-PheOMe / $\beta$ -Asp-PheOMe	3.25	(III)	3.56	(IX)	0.91
Ala-Phe-Gly / Gly-Ala-Phe	1.17	(VII)	1.17	(IX)	1.00
Gly-Gly-Tyr / Tyr-Gly-Gly	1.28	(VIII)	0.93	(IX)	1.38
Gly-Ala-Phe / Gly-Gly-Tyr	1.11	(XI)	1.04	(IX)	1.07
Tyr-Gly-Gly / Gly-Leu-Tyr	1.07	(XI)	1.13	(IX)	0.95
leucine enkephalin / [D-Ala <sup>2</sup> ] leucine enkephalin	1.14	(VII)	1.07	(IX)	1.07
methionine enkephalin / leucine enkephalin	1.40	(VII)	1.13	(IX)	1.24

<sup>a)</sup> Selectivity coefficient using NACE

<sup>b)</sup> Selectivity coefficient using aqueous CE (ACE)

Table 4. Secondary structure fractions of the investigated peptides predicted by CD spectra analysis using SELCON3, CDSSTR, and CONTINLL. Estimation procedure is described in section 2.2.2.

Analyte	solvent	$\lambda$ -range [nm]	Fraction of secondary structure			
			$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	$\beta$ -turn	random coil
ALM F30	BGE I	194 - 240	0.55	0.10	0.15	0.21
	BGE II	190 - 240	0.37	0.17	0.24	0.21
[des-Leuol] AmpA	BGE I	194 - 240	0.46	0.11	0.18	0.24
	BGE II	190 - 240	0.06	0.38	0.24	0.31
[des-Ac] AmpA	Methanol <sup>a)</sup>	195 - 240	0.49	0.11	0.16	0.24
	water <sup>a)</sup>	186 - 240	0.06	0.40	0.23	0.31
[des-AcTrp <sup>1</sup> ] AmpA	Methanol <sup>a)</sup>	195 - 240	0.49	0.10	0.16	0.24
	water <sup>a)</sup>	186 - 240	0.07	0.36	0.24	0.32
melittin	BGE V	197 - 240	0.70	0.03	0.09	0.18
	BGE VI	197 - 240	0.10	0.30	0.25	0.35
cecropin P1	BGE V	197 - 240	0.54	0.06	0.15	0.26
	BGE VI	195 - 240	0.06	0.35	0.22	0.37

<sup>a)</sup> CD measurements in the corresponding CE background electrolytes was not possible because of the high background absorption below 210 nm.

## Figure legends

Figure 1. Electropherograms of  $\alpha$ -helical polypeptides obtained by NACE (A, C, E) compared to aqueous CE (B, D, F). Experimental conditions: running electrolytes, (A) BGE I, (B) BGE II, (C) BGE III, (D) BGE IV, (E) BGE V, (F) BGE VI; fused-silica capillary, 47/40 cm; separation voltage, (A) + 30 kV (9  $\mu$ A), (B) + 25 kV (37  $\mu$ A), (C) + 25 kV (15  $\mu$ A), (D) + 25 kV (26  $\mu$ A), (E) – 25 kV (25  $\mu$ A), (F) – 25 kV (27  $\mu$ A).

Figure 2. Electropherograms of 10 oligopeptides obtained by NACE (A, C, E) compared to aqueous CE (B, D, F). Experimental conditions: running electrolytes, (A, C, E) BGE VII, (B, D, F) BGE IX; fused-silica capillary, 67/60 cm; separation voltage, (A, C, E) + 30 kV (16  $\mu$ A), (B, D, F) + 30 kV (22  $\mu$ A). Peak identification, 1 - leucine enkephalin, 2 - [D-Ala<sup>2</sup>] leucine enkephalin, 3 - methionine enkephalin, 4 - L-Ala-L-Phe / D-Ala-D-Phe, 5 - D-Ala-L-Phe / L-Ala-D-Phe, 6 - Ala-Phe-Gly, 7 - Gly-Ala-Phe, 8 - Gly-Gly-Tyr, 9 - Tyr-Gly-Gly, 10 - Gly-Leu-Tyr.

Figure 3. Circular dichroism spectra of ALM F30 and [des-Leuol] AmpA in aqueous buffer (BGE I) and methanolic buffer (BGE II). For experimental details see section 2.2.2.



Figure 1.

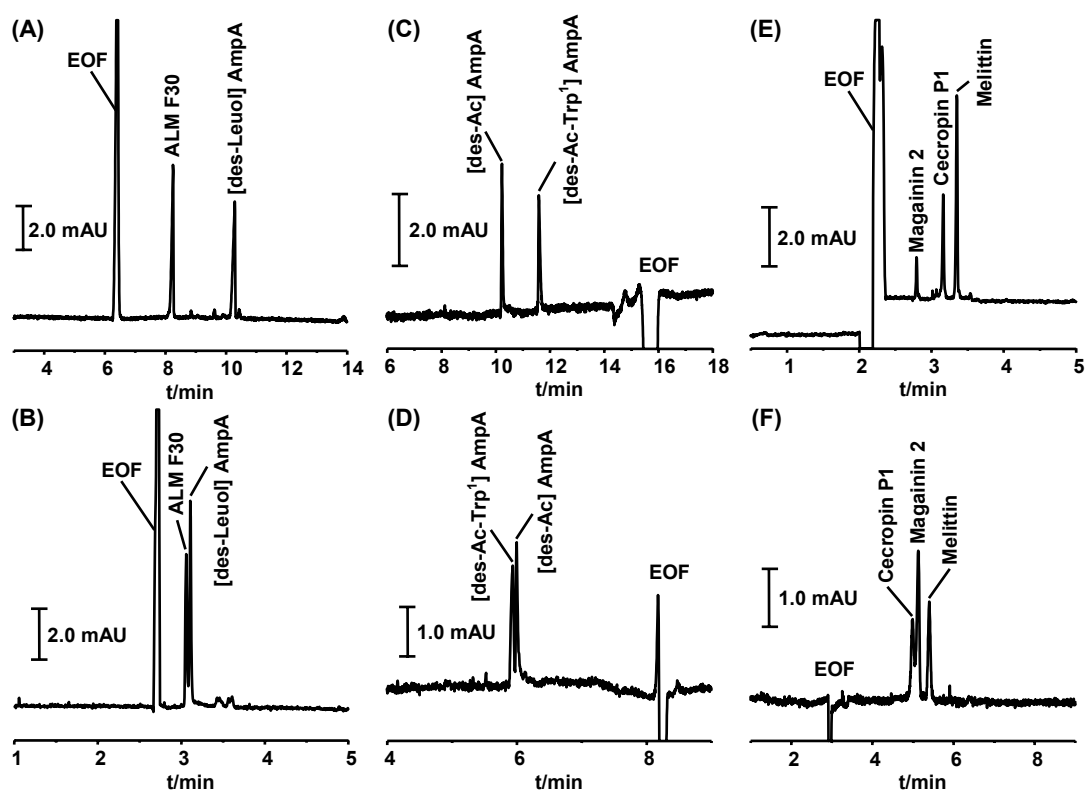


Figure 2.

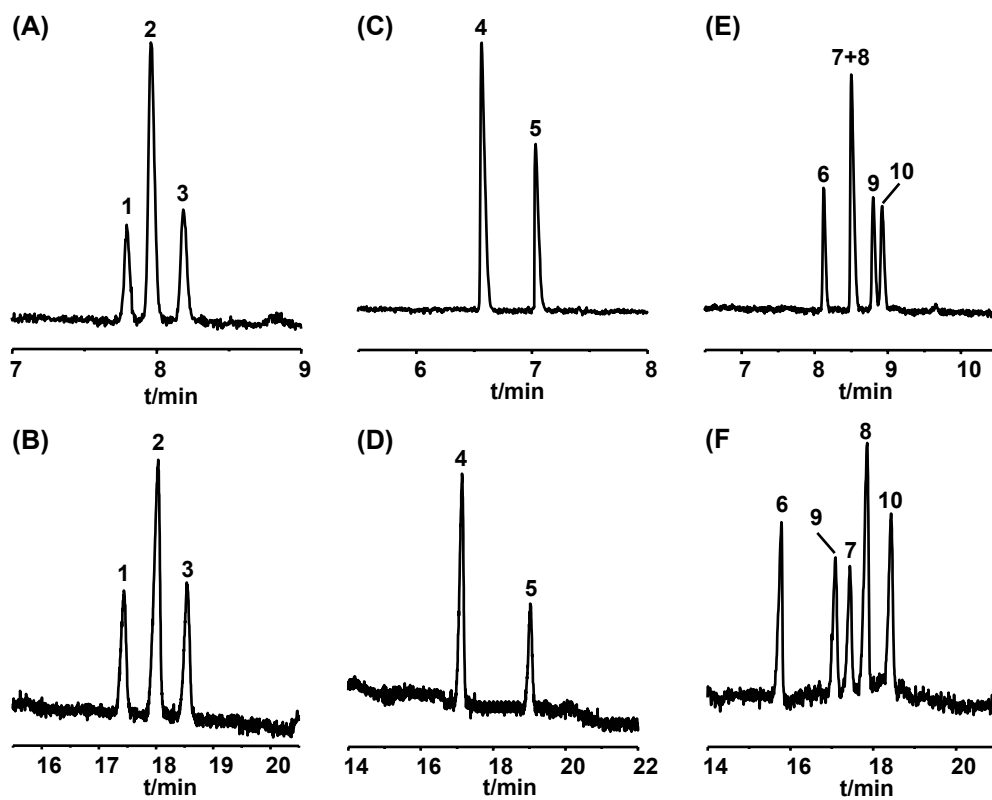
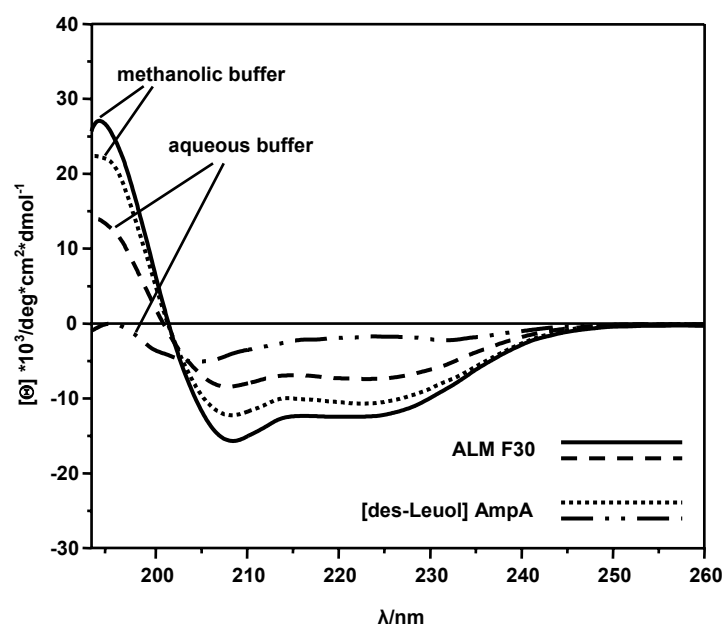


Figure 3.



### 4.3      **Manuskript 3**

Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry

A. Psurek, C. Neusüß, E. Balaguer, D. Imhof, T. Degenkolb, H. Brückner, G. K. E. Scriba, *Journal of Peptide Science*, im Druck (Datum der Annahmebestätigung: 25.07.2005).

# Detection of new amino acid sequences of alamethicins F30 by nonaqueous capillary electrophoresis–mass spectrometry

ARNDT PSUREK,<sup>a</sup> CHRISTIAN NEUSÜß,<sup>b</sup> THOMAS DEGENKOLB,<sup>c</sup> HANS BRÜCKNER,<sup>c</sup> ELVIRA BALAGUER,<sup>d</sup> DIANA IMHOF<sup>e</sup> and GERHARD K. E. SCRIBA<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> University of Jena, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

<sup>b</sup> Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

<sup>c</sup> University of Giessen, Interdisciplinary Research Center, Department of Food Sciences, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany

<sup>d</sup> University of Barcelona, Department of Analytical Chemistry, Av. Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

<sup>e</sup> University of Jena, Department of Biochemistry, Philosophenweg 12, 07743 Jena, Germany

Received 19 May 2005; Accepted 25 July 2005

**Abstract:** The microheterogeneous alamethicin F30 (ALM F30) isolated from the fermentation of *Trichoderma viride* strain NRRL 3199 was analyzed by nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ion-trap mass spectrometry (ESI-IT-MS) and electrospray time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS). Tandem ESI-IT-MS was used for elucidation of the amino acid sequence based on the fragmentation pattern of selected parent ions. The MS/MS spectra using the  $[M + 3H]^{3+}$  or  $[M + 2H]^{2+}$  ions as precursor ions displayed the respective b- and the y-type fragments resulting from cleavage of the particularly labile Aib–Pro bond. The MS<sup>3</sup> of these fragments generated the b acylium ion series, as well as internal fragment ion series. Eleven amino acid sequences were identified, characterized by the exchange of Ala to Aib in position 6, Gln to Glu in positions 7 or 19 as well as the loss of the C-terminal amino alcohol. In addition, two truncated pyroglutamyl peptaibols were found. Overall, seven new sequences are reported compared to earlier LC–MS studies. The composition of the components was confirmed by on-line ESI-TOF-MS detection. Mass accuracy well below 5 ppm was observed. Quantification of the individual components was achieved by a combination of UV and TOF-MS detection. Copyright © 2005 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** nonaqueous capillary electrophoresis; mass spectrometry detection; peptaibiotics; polypeptide antibiotics; peptaibols; alamethicin F30;  $\alpha$ -aminoisobutyric acid; pyroglutamic acid

## INTRODUCTION

Alamethicins are 20-residue peptaibol peptides isolated from the culture broth of the mold *Trichoderma viride* [1,2] exhibiting interesting physicochemical and biological activities, such as the formation of voltage-dependent ion channels in bilayer lipid membranes, as well as antibiotic activities [3]. The voltage-dependent ion channel formation by alamethicin can be described by the dipole flip-flop gating model of Boheim and Jung [4,5] based on electrical field-induced transbilayer orientational movements of single molecules. The conductance states of the ion conductivity pores vary with the number of parallelly arranged  $\alpha$ -helices. Recently, single pore states could be stabilized by C-terminal conjugation of alamethicin with fullerene or a membrane-anchoring lipopeptide [6].

Peptaibols are linear peptides composed of 5–20 amino acids [7]. These compounds are exclusively biosynthesized by fungicolous, plant or entomopathogenic fungi, thus assuming potential importance in the parasitic life cycle of the producers [8]. The nonribosomal biosynthesis includes nonproteinogenic amino acids, in particular  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib).

Aib residues are conformationally restricted and favor the formation of  $3_{10}$ - and  $\alpha$ -helical structures. Peptaibols are amphiphilic because of the acylated, nonpolar N-terminus and the more polar, C-terminal amino alcohol. The name 'peptaibol' reflects the characteristics of this class of compounds being peptides containing Aib and a C-terminal amino alcohol.

Depending on the fermentation conditions, *T. viride* produces the neutral alamethicins F50 (ALM F50) or the acidic peptaibols alamethicins F30 (ALM F30) [2]. Both are microheterogeneous mixtures of closely related sequential analogs that possess a phenylalaninol (Pheol or Fol) at the C-terminus, while the N-terminus is acetylated. ALM F50 and ALM F30 differ in the amino acid in position 18, which is the (neutral) glutamine in the case of ALM F50 and the (acidic) glutamate residue in the case of ALM F30 [2,9]. The structure of ALM F30 has been confirmed by total synthesis [10].

Tandem mass spectrometry, especially electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) coupled to quadrupole, ion-trap (IT) or time-of-flight (TOF) mass analyzers have been proven useful for structural studies of peptaibols [8]. The separation of the individual components of ALM F50 and ALM F30 has been achieved by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and the structure of the components was determined

\* Correspondence to: G. K. E. Scriba, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany; e-mail: gerhard.scriba@uni-jena.de

PSUREK *ET AL.*

by HPLC–ESI-MS<sup>n</sup> by Brückner and coworkers [2]. The acidic ALM F30 and the neutral ALM F50 were isolated from the culture broth by XAD-2 column chromatography and separated by silica gel chromatography. The composition of the individual peptaibols was subsequently determined by HPLC–ESI-MS<sup>n</sup>. According to this study, ALM F30 consists of two major components that differ in the amino acid in position 6 (Ala or Aib) and eight minor components.

Nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) using solvents such as methanol, acetonitrile or *N*-methylformamide, instead of water, for the preparation of the background electrolytes is increasingly applied to analytical problems [11]. Important parameters such as efficiency and selectivity can be effectively modified when aqueous buffers are replaced by nonaqueous electrolyte solutions. Organic solvents favor interactions that are weak in aqueous media. Furthermore, the solubility and stability of many analytes and additives are enhanced in nonaqueous solvents. Moreover, nonaqueous solvents may be preferable for electrochemical detection as well as for electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) detection [12].

Traditionally, peptides as hydrophilic compounds are analyzed by capillary electrophoresis (CE) using aqueous background electrolytes. However, beneficial effects of organic solvents for the separation of hydrophobic peptides in aqueous CE media have been described. For example, an acidic aqueous buffer containing 20% 2-propanol as organic modifier was applied to the analysis of isomeric *N*-palmitoylated bradykinin and *O*-palmitoylated gonadorelin as well as (cysteinyl-4,5)-palmitoylated peptide SP-C14 [13]. Hodges and coworkers described the separation of 18-residue  $\alpha$ -helical amphipathic peptide diastereomers by capillary zone electrophoresis with highly concentrated (up to 400 mM) perfluorinated acid ion-pairing reagents in aqueous solution [14]. The authors attributed the successful separation to conformational changes between the peptide diastereomers and differences in hydrophobicity of the nonpolar face of the amphipathic  $\alpha$ -helices and their interactions with the hydrophobic anionic ion-pairing reagent. On-line NACE–MS of hydrophobic peptides gramicidin S and bacitracin has been demonstrated [15]. The separations were achieved in an acetonitrile/methanol-based system containing ammonium acetate and formic acid. ESI-MS allowed the determination of three minor components in the case of gramicidin S and one minor component in the case of bacitracin. The current status of CE–MS for the analysis of proteins and peptides including NACE–MS has been recently summarized [16].

The separation of peptaibols by CE has not been described previously. However, because of their lipophilic nature, NACE seems to be a suitable electromigration technique for this class of compounds. Thus, the present study was conducted in order to

evaluate the potential of NACE coupled to MS for the analysis of peptaibols including the determination of their amino acid sequence. The natural ALM F30 was selected as model peptaibols because these compounds contain a glutamic acid residue in position 18 that can be deprotonated for electrophoretic analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Methanol, acetonitrile, 2-propanol, dichloromethane (all HPLC grade quality), ammonium acetate and silica gel 60 (mesh size <0.063 mm) were purchased from VWR International (Darmstadt, Germany). Ammonium formate was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium acetate and ammonium formate were dried overnight in a desiccator over silica before use. ALM F30 was isolated from fermentations of *T. viride* strain NRRL 3199 as described previously [2].

The peptides Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol and Glu-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol were synthesized by solid-phase synthesis using the Fmoc strategy for the assembly of the peptide on the solid support [17,18]. The Fmoc-protected terminating amino alcohol was directly anchored onto the 2-chlorotriptyl chloride resin. Activation of the sterically hindered Aib was achieved using tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphate (TFFH) as coupling reagent, as described by Carpino *et al.* [18]. The peptides were purified by preparative HPLC, and their identity was confirmed by MALDI-MS.

### Capillary electrophoresis

CE with UV detection was performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) equipped with a diode-array detector at 25 °C using 50- $\mu$ m i.d. fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with an effective length of 50 cm and a total length of 57 cm. UV detection was carried out at 215 nm at the cathodic end of the capillary. Sample solutions were introduced at the anodic end by hydrodynamic injections at a pressure of 0.5 psi for 3 s.

CE–MS experiments were performed using a Hewlett Packard <sup>3D</sup>CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Separations were performed at 25 °C in 50- $\mu$ m i.d. fused-silica capillaries with a length of 57 cm by application of a separation voltage of 30 kV (sprayer grounded). A pressure of 50 mbar for 4 s was used for sample injection.

New capillaries were rinsed for 30 min with 0.1 M sodium hydroxide, 5 min with water and 10 min with methanol followed by the separation medium for 10 min. Between analyses, the capillary was flushed with the running buffer for 2 min. When not in use, it was washed with the respective solvent and then stored under dry conditions.

### Electrospray Ionization Mass Spectrometry

On-line coupling of the CE instrument to the mass spectrometer detector was achieved with an Agilent coaxial sheath-liquid sprayer interface (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The sheath liquid, 2-propanol:water (1:1, v/v) containing 1% formic acid, was supplied at a flow rate of 4  $\mu$ l/min by a

syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hill, IL, USA). Nebulizer gas pressure was set to 2–3 psi. All ESI-MS experiments were carried out in positive ionization mode at 4500 V.

ESI-IT-MS measurements were performed using an ion-trap mass spectrometer Esquire HCT<sup>TM</sup> (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Mass spectra were acquired from  $m/z$  200 to 1500 in the scanning mode and automatic switching between MS and MS<sup>n</sup>. Ions were scanned at a speed of 8300  $m/z$  per s in the MS mode in order to achieve sufficient resolution for charge attribution of triply charged peptides. The enhanced auto-MS<sup>n</sup> settings were optimized to get as many MS<sup>n</sup> spectra over a selected time period as possible. This was achieved by scanning at 26000  $m/z$  per s and active exclusion after two spectra per mass in a given time window of 0.5 min. MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup> spectra were acquired selecting one (MS<sup>2</sup>) or two (MS<sup>3</sup>) most abundant precursors or by adding preferred masses in the case of follow-up experiments.

ESI-TOF-MS measurements were performed on an orthogonal TOF mass spectrometer micrOTOF<sup>TM</sup> (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). The mass spectrometer operated in an  $m/z$  range 200–1500.

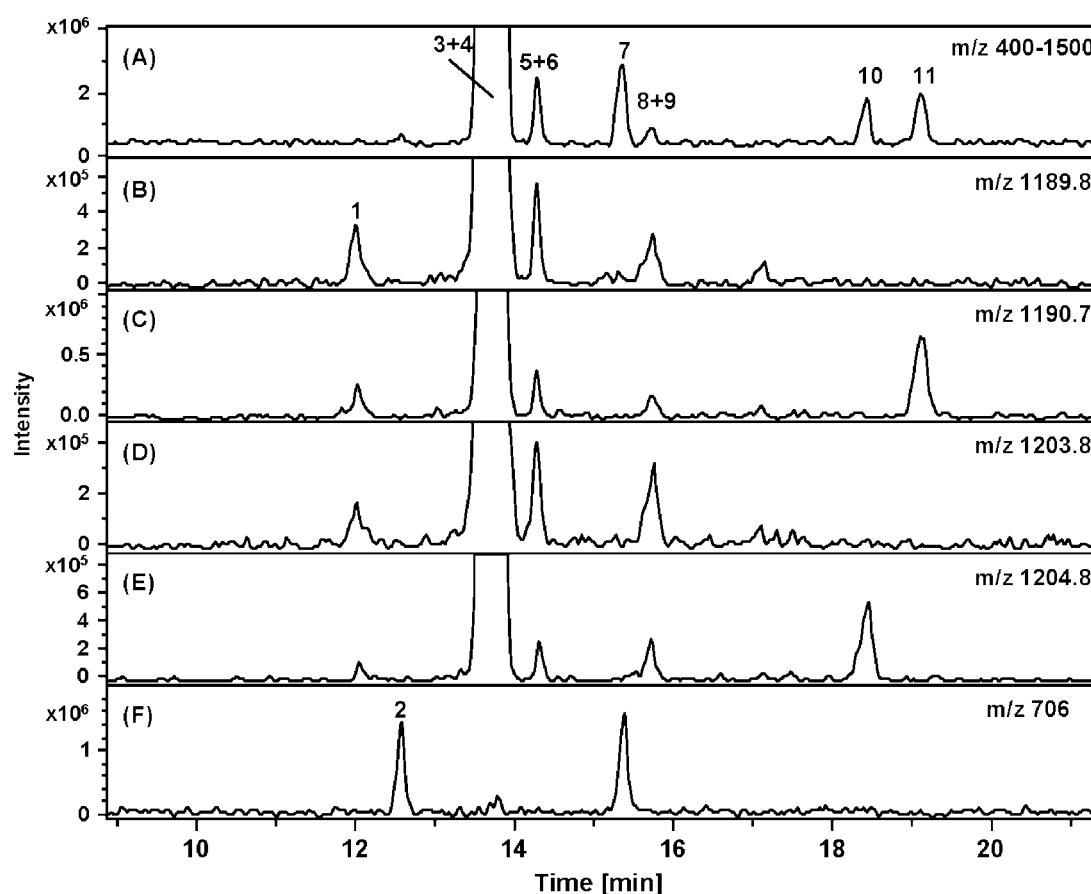
Data processing was performed by DataAnalysis<sup>TM</sup> software (Version 3.0; Bruker Daltonik). The peptide MS fragments are labeled according to standard rules [19,20].

## RESULTS AND DISCUSSION

### NACE Separation of ALM F30

NACE separation of the microheterogeneous ALM F30 was evaluated in methanol, acetonitrile and mixtures of these solvents using ammonium acetate- and ammonium formate-based electrolytes. The solvents are widely used in NACE because of their appropriate dielectric constant-to-viscosity ratio [11]. While electrolyte solutions in acetonitrile and acetonitrile-methanol mixtures did not afford satisfactory separations because of the low mobility of the analytes in these solvents, good separation selectivity was obtained using methanol-based electrolytes. 12.5 mM ammonium formate in methanol yielded six separated peaks using UV detection (data not shown).

Subsequent NACE-ESI-MS was performed using this background electrolyte and a sheath liquid consisting of 1% formic acid in a 1:1 mixture of 1-propanol and water, which provided stable spray and protonation conditions for the peptaibols. Figure 1 shows the base peak electropherogram of



**Figure 1** Extracted ion electropherograms of NACE with full-scan ESI-IT-MS detection. (A) Base peak electropherogram. (B–E) Mass traces of the different  $b_{13}$  fragments (see Table 2). (F)  $[M + 2H]^{2+}$  pseudomolecular ion of the Pyr-containing peptides. Experimental conditions: capillary dimensions, 57 cm  $\times$  50  $\mu$ m i.d.; running electrolyte, 12.5 mM ammonium formate in methanol; separation voltage, 30 kV (18  $\mu$ A); for ESI-MS conditions see Experimental Section. Sample concentration: 500  $\mu$ g/ml in methanol. Peak identity: numbers refer to peptide sequences shown in Table 1.

ALM F30 (Figure 1A) as well as electropherograms of selected mass traces of the characteristic  $b_{13}$  fragment ions obtained with full-scan ESI-IT-MS (Figure 1B–E). The identification of the individual components and the determination of their amino acid sequences are discussed below. The extracted ion electropherogram (EIE) of the  $b_{13}$  fragments at  $m/z$  1189.9 (Figure 1B) and 1203.8 (Figure 1D) as well as at  $m/z$  1190.7 (Figure 1C) and 1204.8 (Figure 1E) with mass differences of 14 Da correspond to the exchange of Ala by Aib in the peptaibols. Most of the respective compounds comigrated, as the mass difference of 14 Da is apparently not large enough to be translated into electrophoretic separations of otherwise identical peptaibols with molecular masses of about 1900–1950 Da. The EIE of  $m/z$  706 (Figure 1F) corresponds to the doubly charged pseudomolecular  $[M + 2H]^{2+}$  ions of truncated pyrroglutamyl (Pyr) peptaibols.

### Amino Acid Sequence Determination

Table 1 summarizes the amino acid sequences of ALM F30 as determined by NACE–ESI-MS analysis. A different numbering as compared to the nomenclature applied in Ref. 2 of the ALM F30 peptides is used for reasons of simplicity. The mass fragments and molecular ions of all components of ALM F30 determined in this study are compiled in Table 2. The majority of the diagnostic ions was identified via NACE–ESI-IT-MS<sup>n</sup>

in the positive ion mode from specific precursor ions such as the triply and doubly charged pseudomolecular  $[M + 3H]^{3+}$  and  $[M + 2H]^{2+}$  ions for MS<sup>2</sup> spectra and from the  $b_{13}$  and  $y_7$  fragments, respectively, in the case of the MS<sup>3</sup> spectra. Figures 2 and 3 show the ESI-IT-MS<sup>3</sup> spectra of [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**) and [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**), respectively, as examples.

The MS spectra show the doubly and triply charged pseudomolecular ions,  $[M + 2H]^{2+}$  or  $[M + 3H]^{3+}$ , as well as the corresponding ammonium adducts in some cases. Moreover,  $b_{13}$ - and  $y_7$ -fragments are generated, resulting from fragmentation of the particularly labile Aib–Pro bond. The tertiary amide bond undergoes a preferential cleavage, leading to an *N*-terminal acylium ion (*b*-type fragment) and a diprotonated C-terminal ion (*y*-type fragment) [21]. These characteristic fragments were also obtained in the ESI-IT-MS full-scan mode (without MS<sup>n</sup>) illustrating the facile cleavage of the Aib–Pro bond. Other peptaibols such as harzianins [21], stilboflavins [22], trichotoxins [23] and trichofumins [24] exhibit similar fragmentation patterns in ESI-MS. The MS<sup>2</sup> spectra using the  $[M + 3H]^{3+}$  or  $[M + 2H]^{2+}$  ions as precursor ions displayed the respective *b*- and the *y*-type fragments resulting from cleavage of the Aib–Pro bond. The selection of the appropriate precursor ions allowed the identification and amino acid sequence determination also in case of comigrating substances.

In the case of the 20- and 19-residue peptaibols, the triply charged pseudomolecular ions  $[M + 3H]^{3+}$  were selected as the precursor ions for the MS<sup>2</sup> analysis

**Table 1** Sequences and relative quantities (%) of the ALM F30 peptides characterized by NACE–ESI-MS in the microheterogeneous mixture. Exchanged amino acid positions are highlighted in bold letters. Abbreviations of the amino acids are according to the one-letter code, Ac – acetyl, U – Aib, Pyr – pyrroglutamic acid. The denotation of the ALM F30 peptides identified by HPLC–MS [2] is listed in the third column

	Nomenclature in Ref. 2	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<b>1</b> ALM F50	F50/5	— <sup>a</sup>	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol
<b>2</b> [desAA(1–6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F50	—	0.4							<b>Pyr</b>	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Fol	
<b>3</b> [Aib <sup>6</sup> ] ALM F30	F30/7	38.9	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol
<b>4</b> ALM F30	F30/3	51.0	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol
<b>5</b> [Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	—	1.4	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	<b>E</b>	Fol
<b>6</b> [Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	—	1.2	Ac	U	P	U	A	U	<b>U</b>	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	<b>E</b>	Fol
<b>7</b> [desAA(1–6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F30	—	2.9							<b>Pyr</b>	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol	
<b>8</b> [desPheol] ALM F30	—	0.6	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	
<b>9</b> [Aib <sup>6</sup> ,desPheol] ALM F30	—	0.7	Ac	U	P	U	A	U	<b>U</b>	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	
<b>10</b> [Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	—	1.3	Ac	U	P	U	A	U	<b>U</b>	<b>E</b>	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol
<b>11</b> [Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	F30/6	1.7	Ac	U	P	U	A	U	A	<b>E</b>	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Fol

<sup>a</sup> Not quantified, because the uncharged ALM F50 comigrates with the EOF.

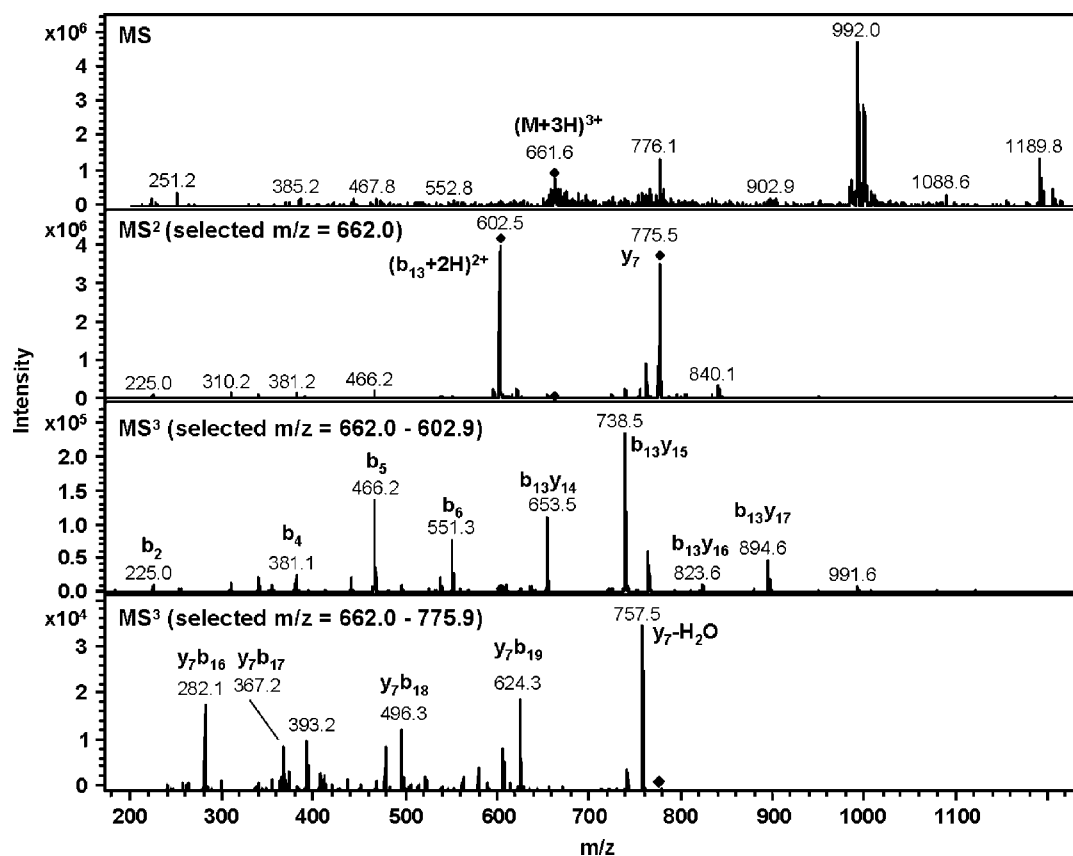
**Table 2** Fragment ions, pseudomolecular ions and adducts of pseudomolecular ions ( $m/z$  ratio) of ALM F30 determined by NACE-ESI-MS. The numbering of the components corresponds to Table 1

Diagnostic ion	$m/z$					Diagnostic ion		$m/z$		Diagnostic ion		$m/z$	
	1	3	4	5	6	10	11	2	7			8	9
$b_2$	225.1	225.1	225.1	225.1	225.1	225.1	225.1	n.d.	197.1	$b_2$		225.1	225.1
$b_3$	310.2	310.2	310.2	310.2	310.2	310.2	310.2	296.2	296.2	$b_3$		310.2	310.2
$b_4$	381.2	381.2	381.2	381.2	381.2	381.2	381.2	381.2	381.2	$b_4$		381.2	381.2
$b_5$	466.3	466.3	466.3	466.3	466.3	466.3	466.3	438.2	438.2	$b_5$		466.3	466.3
$b_6$	537.3	551.3	537.3	537.3	551.3	551.3	537.3	551.3	551.3	$b_6$		537.3	551.3
$b_7$	665.4	679.4	665.4	665.4	679.4	680.4	666.3	636.4	636.4	$b_7$		665.4	679.4
$b_8$	750.4	764.4	750.4	750.4	764.4	765.4	751.4	—	—	$b_8$		750.4	764.4
$b_9$	849.5	863.5	849.5	n.d.	n.d.	864.5	850.5	—	—	$b_9$		849.5	863.5
$b_{10}$	934.5	948.5	934.5	934.5	948.5	949.5	935.5	—	—	$b_{10}$		934.5	948.5
$b_{13}$	1189.7	1203.7	1189.7	1189.7	1203.7	1204.7	1190.7	—	—	$b_{13}$		1189.7	1203.7
$[b_{13} + 2H]^2+$	595.8	602.9	595.8	595.8	602.9	603.4	596.3	—	—	$[b_{13} + 2H]^2+$		595.8	602.9
$y_7$	774.4	775.4	775.4	776.4	776.4	775.4	775.4	774.4	775.4	$y_7$		774.4	775.4
$[y_7 - H_2O]$	756.4	757.4	757.4	758.4	758.4	757.4	757.4	756.4	757.4	$[y_7 - H_2O]$		756.4	757.4
$y_7b_{19}$	623.3	624.3	624.3	625.3	625.3	624.3	624.3	623.3	624.3	$y_7b_{13}$		623.3	624.3
$y_7b_{18}$	495.3	496.3	496.3	496.3	496.3	496.3	496.3	495.3	496.3	$y_7b_{12}$		495.3	496.3
$y_7b_{17}$	367.2	367.2	367.2	367.2	367.2	367.2	367.2	367.2	367.2	$y_7b_{11}$		367.2	367.2
$y_7b_{16}$	282.2	282.1	282.2	282.2	282.2	282.2	282.2	282.2	282.2	$y_7b_{10}$		282.2	282.2
$b_{13}y_{10}$	256.2	256.2	n.d.	256.2	256.2	256.2	256.2	256.2	256.2	$b_{13}y_9$		256.2	256.2
$b_{13}y_{11}$	341.2	341.2	341.2	341.2	341.2	341.2	341.2	341.2	341.2	$b_{13}y_{10}$		341.2	341.2
$b_{13}y_{12}$	440.3	440.3	440.3	440.3	440.3	440.3	440.3	440.3	440.3	$b_{13}y_{11}$		440.3	440.3
$b_{13}y_{13}$	525.3	525.3	525.3	525.3	525.3	525.3	525.3	525.3	525.3	$b_{13}y_{12}$		525.3	525.3
$b_{13}y_{14}$	653.4	653.4	653.4	653.4	653.4	654.4	654.4	—	—	$b_{13}y_{13}$		653.4	653.4
$b_{13}y_{15}$	724.4	738.4	724.4	724.4	738.4	739.4	725.4	—	—	$b_{13}y_{14}$		724.4	738.4
$b_{13}y_{16}$	809.5	823.5	809.5	809.5	823.5	824.5	810.5	—	—	$b_{13}y_{15}$		809.5	823.5
$b_{13}y_{17}$	880.5	894.5	880.5	880.5	894.5	895.5	881.5	—	—	$b_{13}y_{16}$		880.5	894.5
$[M + 2H]^2+$	982.1	989.6	982.6	983.1	990.1	990.0	983.1	705.4	705.9	$[M + 2H]^2+$		916.0	923.0
$[M + NH_4 + H]^2+$	990.6	998.1	991.1	991.6	998.6	998.5	991.6	713.9	714.4	$[M + NH_4 + H]^2+$		924.5	931.5
$[M + 3H]^3+$	655.1	660.1	655.4	655.7	660.4	660.4	655.7	n.d.	n.d.	$[M + 3H]^3+$		611.0	615.7
$[M + NH_4 + 2H]^3+$	660.8	665.8	661.1	661.4	666.1	666.1	661.4	n.d.	n.d.	$[M + NH_4 + 2H]^3+$		616.7	621.4

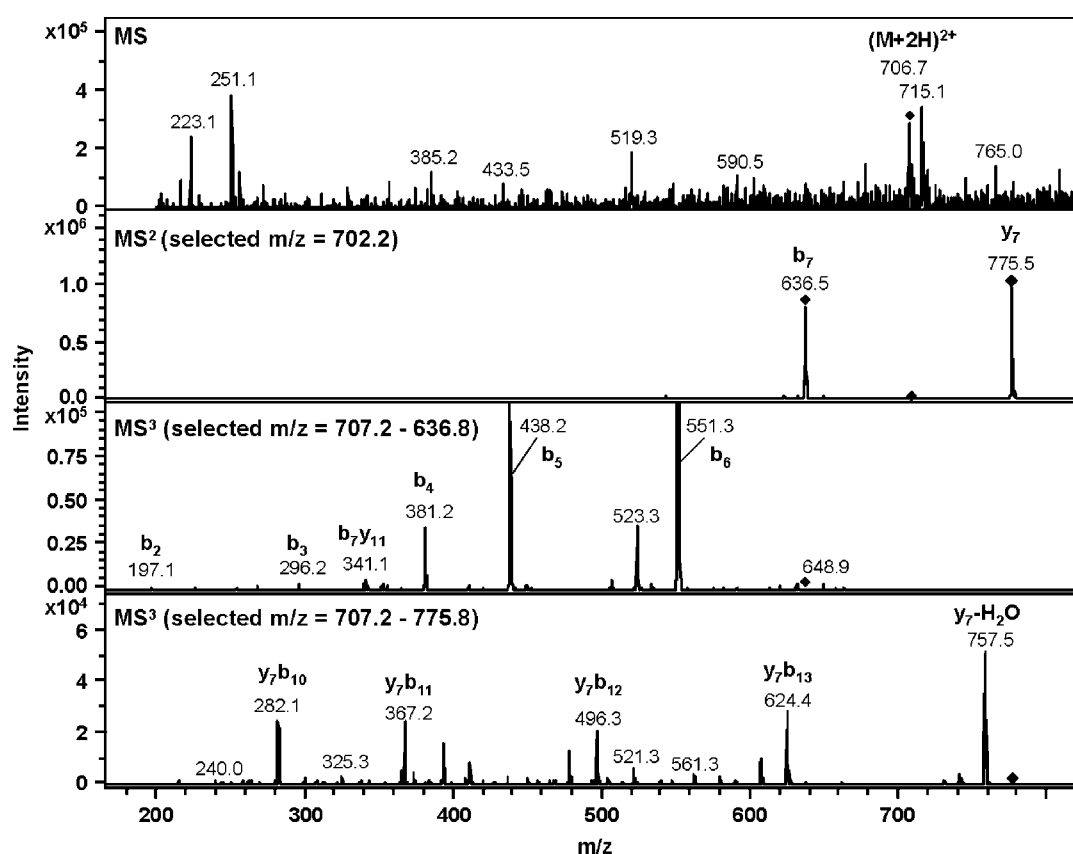
n.d. – not determined.



PSUREK ET AL.



**Figure 2** ESI-IT-MS<sup>n</sup> ( $n = 1-3$ ) of [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**).



**Figure 3** ESI-IT-MS<sup>n</sup> ( $n = 1-3$ ) of [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**).

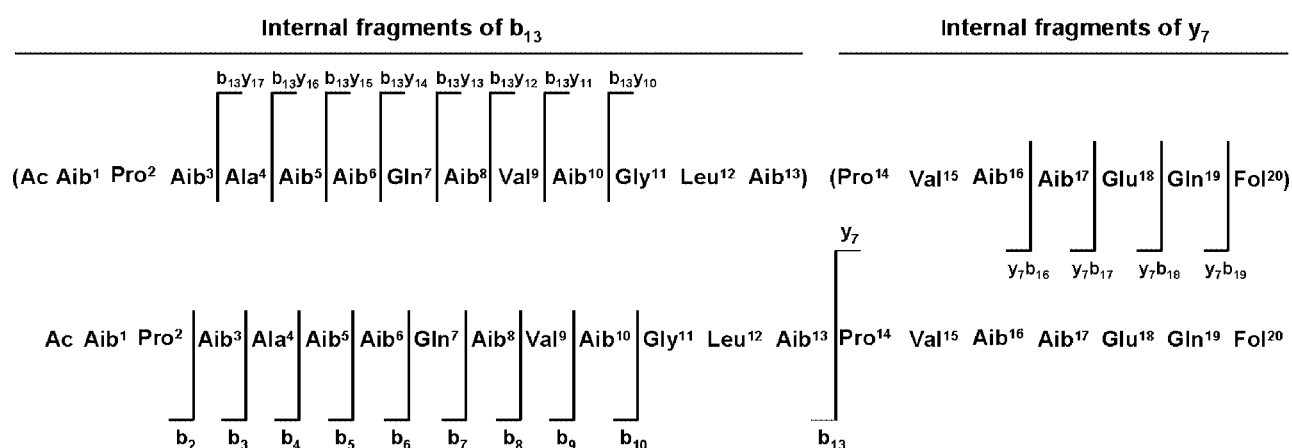
(Figure 2). MS<sup>2</sup> generated the b<sub>13</sub> and the y<sub>7</sub> fragment or, in case of the desPheol ALM F30 peptides, the y<sub>6</sub> fragment (data not shown). The b<sub>13</sub> fragment is detected as a doubly charged ion. The MS<sup>3</sup> of the diprotonated b<sub>13</sub> fragment ([b<sub>13</sub> + 2H]<sup>2+</sup>) generated the b<sub>2</sub> – b<sub>10</sub> acylium ion series, as well as the monoprotonated internal fragments b<sub>13</sub>y<sub>10</sub> – b<sub>13</sub>y<sub>17</sub> (Table 2). The C-terminal sequences of the peptides were determined by MS<sup>3</sup> of the y<sub>7</sub> fragment and, in the case of the desPheol ALM F30 peptides, of the y<sub>6</sub> fragment. The resulting internal ion series (y<sub>7</sub>b<sub>19</sub> – y<sub>7</sub>b<sub>16</sub>) are formed by the cleavage of C-terminal residues while the charge remains at the N-terminus. Loss of water from the y<sub>7</sub> fragment leads to a y<sub>7</sub> – H<sub>2</sub>O fragment ion in the MS<sup>3</sup> spectra. The C-terminal position of Pheol was concluded from the mass difference of 150 + 1 Da from diprotonated y<sub>7</sub> and monoprotonated y<sub>7</sub>b<sub>19</sub> fragments. A fragmentation scheme is presented in (Figure 4) showing the series of diagnostic ions and internal fragments used for sequence determination of [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**).

The signals of the b<sub>2</sub> ions were recorded at *m/z* 225 corresponding to the fragment Ac-Aib-Pro. The internal fragments b<sub>13</sub>y<sub>10</sub> (*m/z* 256) and y<sub>7</sub>b<sub>16</sub> (*m/z* 282) correspond to the Gly-Leu-Aib and the Pro-Val-Aib tripeptides, respectively. The sequences of these three fragments were derived from earlier HPLC-MS investigations of ALM F30 [2,9] assuming sequence analogy.

The sequences of the two pyroglutamyl peptaibols (14-residue peptides) [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**) and [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) were concluded from MS<sup>3</sup> analysis of the b<sub>7</sub> and y<sub>7</sub> fragments generated by the cleavage of the Aib-Pro bond of the pseudomolecular ion [M + 2H]<sup>2+</sup> (Figure 3 for [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30). The internal fragments of b<sub>7</sub> are the b<sub>2</sub> – b<sub>7</sub> acylium ion series and the monoprotonated fragments b<sub>7</sub>y<sub>10</sub> – b<sub>7</sub>y<sub>13</sub> analogous to the b<sub>13</sub> fragment of the 20-residue ALM F30 peptaibols. The y<sub>7</sub> fragment formed the y<sub>7</sub>b<sub>10</sub> – y<sub>7</sub>b<sub>13</sub> internal fragment series. In contrast to

the 20-residue ALM F30 peptides, the sequence of the b<sub>7</sub>y<sub>10</sub> fragment at *m/z* 256 corresponding to the Gly-Leu-Aib tripeptide could be confirmed by the b<sub>5</sub> – b<sub>7</sub> fragment ions.

Pandey *et al.* reported the formation of pyroglutamyl peptide fragments in an electron-impact mass spectrometry study of ALM F30 [9]. However, the formation of pyroglutamyl peptides during the ESI process has not been described. In order to evaluate the fragmentation pattern of Glu *versus* Pyr peptides, two model peptides containing reduced C-termini with the amino acid sequences Glu-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Glu-hexapeptide) and Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Pyr-hexapeptide) were synthesized and subjected to NACE-ESI-MS. The ESI-IT-MS<sup>3</sup> spectra of the two model hexapeptides displayed the respective b-type and the y-type ion series. The [M + H]<sup>+</sup> ions were selected as the precursor ions, and the fragment ions are listed in Table 3. In the spectrum of the Glu-hexapeptide, the b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> and b<sub>4</sub> fragments were detected and also additional signals corresponding to the loss of water from the b<sub>2</sub> – b<sub>4</sub> fragments. These fragments have identical *m/z* values as the b<sub>2</sub> – b<sub>4</sub> fragments of the Pyr-hexapeptide so that formation of Pyr peptides in the ESI source can be assumed. However, the Glu-hexapeptide can be clearly distinguished by the presence of the b<sub>2</sub> – b<sub>5</sub> fragments 18 mass units higher than those of the Pyr-hexapeptide. In addition, both peptides have different electrophoretic mobilities. Thus, it can be concluded that the truncated Pyr peptaibol components in ALM F30 are in fact present in the investigated sample and not an artefact generated in the ESI ion source because the compounds did not display the respective 18-mass-units-higher fragments in the spectra. Interestingly, [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**) displayed a low anodic mobility despite the fact that this compound should be neutral as it does not contain a charged amino acid. Apparently, under the present NACE conditions, a partial negative charge is induced. Moreover, the anodic mobility of [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**)



**Figure 4** Fragmentation scheme of [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**). Fragments were generated by ESI-IT-MS<sup>n</sup> (*n* = 1–3).

was confirmed by the anodic mobility of the Pyr model hexapeptide.

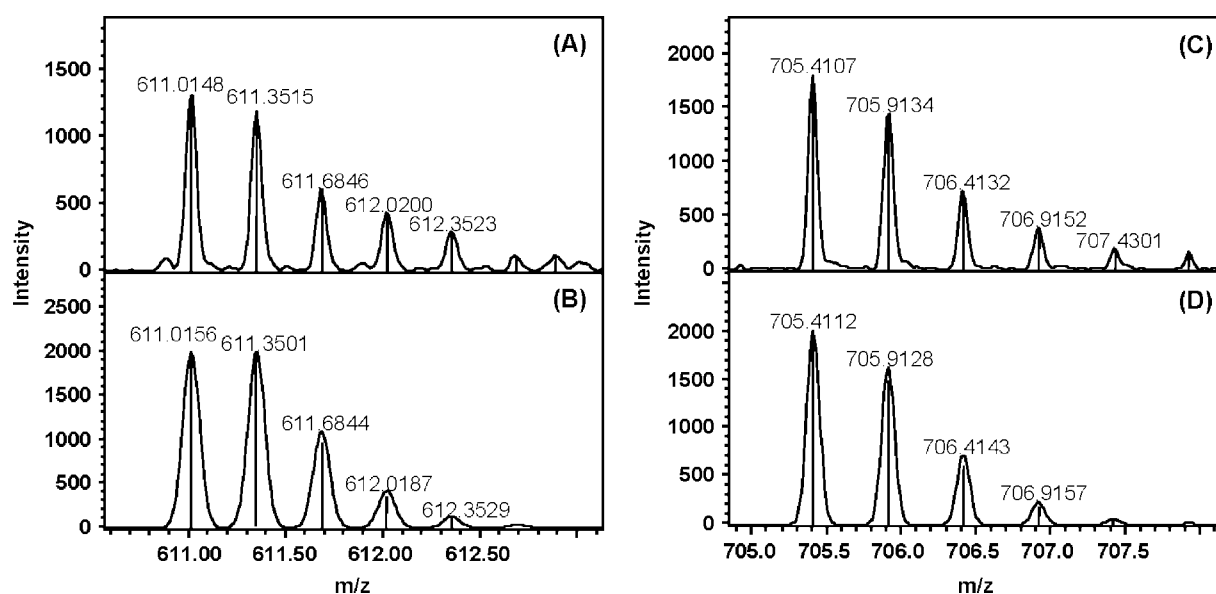
The amino acid composition of the ALM F30 components obtained by NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup> was confirmed by NACE-ESI-TOF-MS analysis. Doubly or triply charged molecular ions were the most abundant ions in the spectra. Fragmentation was not observed (data not shown). The high resolution of the TOF mass analyzer allowed the analysis of the isotope pattern as shown in Figure 5 for the  $[M + 3H]^{3+}$  ion of [desPheol] ALM F30 (**8**) and the  $[M + 2H]^{2+}$  ion of [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) including a comparison of the experimental spectra with the simulated isotope pattern obtained

**Table 3** Fragment ions, pseudomolecular ions and adducts of pseudomolecular ions ( $m/z$  ratio) of the model hexapeptides Glu-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Glu-hexapeptide) and Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Pyr-hexapeptide)

Ion	$m/z$	
	Glu-hexapeptide	Pyr-hexapeptide
b <sub>2</sub>	215.1	197.1
b <sub>3</sub>	314.2	296.2
b <sub>4</sub>	399.2	381.2
b <sub>5</sub>	456.2	438.2
y <sub>2</sub>	157.1	157.1
y <sub>3</sub>	242.2	242.2
y <sub>4</sub>	341.2	341.2
y <sub>5</sub>	426.3	426.3
[b <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> O]	197.1	—
[b <sub>3</sub> - H <sub>2</sub> O]	296.2	—
[b <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O]	381.2	—
[M + H] <sup>+</sup>	573.3	555.3

by the Bruker DataAnalysis<sup>TM</sup> software. In both examples, the measured isotope pattern was consistent with the calculated isotope pattern, thus confirming the elemental composition, i.e. the amino acid composition of the identified components. This approach was applied to the confirmation of the amino acid composition of all compounds. Table 4 summarizes the experimentally determined monoisotopic  $m/z$  values using ALM F30 as mass calibrant compared to the respective calculated values. With the exception of the neutral ALM F50, mass accuracy was clearly below 5 ppm for the doubly charged ions and below 2 ppm for the triply charged ions. The relative inaccuracy found for ALM F50 may be due to the fact that this compound migrates essentially with the electroosmotic flow (EOF).

Except for the neutral components ALM F50 (**1**) and [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**), the compounds possess a Glu residue in position 18 and carry a negative charge under the applied NACE conditions. Not considering [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**), the Glu<sup>18</sup> derivatives can be divided into pairs characterized by the exchange of Ala by Aib in position 6. This exchange is characteristic for many peptaibol peptides [7]. Compared to the pair of the major components ALM F30 (**4**) and [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**), the other pairs are characterized by an additional carboxy group resulting from the exchange of Gln in position 19 to Glu, i.e. [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**5**) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**6**), the exchange of Gln to Glu in position 7, i.e. [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**10**), or loss of the C-terminal phenylalaninol, i.e. [desPheol] ALM F30 (**8**) and [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (**9**). Except for [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**10**), which are well separated, the peptaibols of the respective pairs comigrate as the mass difference of



**Figure 5** Measured (A, C) and calculated (B, D) isotope pattern of [desPheol] ALM F30 (A, B) and [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (C, D).

**Table 4** Calculated and measured  $m/z$  ratios of the pseudomolecular ions observed in ESI-TOF-MS

	Molecular formula	Monoisotopic molecular mass (Da)	$m/z$ monoisotopic mass					
			$[M + 2H]^{2+}$		$\Delta m$ (ppm)	$[M + 3H]^{3+}$		$\Delta m$ (ppm)
			Measured	Calculated		Measured	Calculated	
<b>1</b> ALM F50	C <sub>92</sub> H <sub>151</sub> N <sub>23</sub> O <sub>24</sub>	1962.09	982.0784	982.0724	+6.1	655.0483	655.0507	-3.7
<b>2</b> [des(1-6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F50	C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>16</sub> O <sub>17</sub>	1408.77	705.4107	705.4112	-0.7	—	—	—
<b>3</b> [Aib <sup>6</sup> ] ALM F30	C <sub>93</sub> H <sub>152</sub> N <sub>22</sub> O <sub>25</sub>	1977.08	989.5723	989.5722	+0.1	660.0507	660.0506	+0.2
<b>4</b> ALM F30	C <sub>92</sub> H <sub>150</sub> N <sub>22</sub> O <sub>25</sub>	1963.07	Calibrant	982.5644	—	Calibrant	655.3787	—
<b>5</b> [Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	C <sub>92</sub> H <sub>149</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1964.05	983.0562	983.0564	-0.2	655.7075	655.7067	+1.2
<b>6</b> [Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	C <sub>93</sub> H <sub>151</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1978.06	990.0609	990.0642	-3.3	660.3798	660.3786	+1.8
<b>7</b> [des(1-6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F30	C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>15</sub> O <sub>18</sub>	1409.75	705.9031	705.9032	-0.1	—	—	—
<b>8</b> [desPheol] ALM F30	C <sub>83</sub> H <sub>139</sub> N <sub>21</sub> O <sub>25</sub>	1830.00	916.0177	916.0198	-2.3	611.0148	611.0156	-1.3
<b>9</b> [Aib <sup>6</sup> ,desPheol] ALM F30	C <sub>84</sub> H <sub>141</sub> N <sub>21</sub> O <sub>25</sub>	1844.01	923.0305	923.0276	+3.1	615.6873	615.6875	-0.3
<b>10</b> [Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	C <sub>93</sub> H <sub>151</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1978.06	990.0634	990.0642	-0.8	660.3797	660.3786	+1.7
<b>11</b> [Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	C <sub>92</sub> H <sub>149</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1964.05	983.0557	983.0564	-0.7	655.7066	655.7067	-0.2

14 Da caused by the exchange of Ala *versus* Aib is not sufficient to be translated into CE separations of peptaibols with masses of approximately 1950 Da under the experimental conditions applied.

Peptaibiotics terminating in a free amino acid or amide instead of a C-terminal 2-amino alcohol residue have been described previously. They comprise XR 586 (Gly at the C-terminus) [25]; trichobrachins TB I A, B, C, and D (Gln at the C-terminus) as well as trichobrachins II A, C, and D (Val at the C-terminus) [26]; lipohexin ( $\beta$ -Ala at the C-terminus) [27,28], pseudokonin KL III (Pro-NH<sub>2</sub> at the C-terminus) [29] and cephaibols P and Q (Ser at the C-terminus) [30].

N-terminal pyroglutamic acid (Pyr) containing peptaibols have not yet been reported. Whether [desAA(1-6), Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**) and [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) are naturally occurring compounds or artifacts caused by the workup or enzymatic degradation of peptaibols in the fermentation process remains to be answered. In order to estimate the possibility of the formation during workup, ALM F30 was heated for 41 h at 100 °C in the crystalline state as well as in dichloromethane/methanol (1 : 1, v/v) in the presence of an equal amount of silica gel G 60 for 4, 8 and 24 h at 70 °C in a closed vial simulating the chromatographic workup [2] of the sample. The samples were analyzed by LC-MS and CE. Neither treatment increased the amount of the truncated pyroglutamyl peptides compared to untreated samples. Thus, formation of these peptides during workup appears to be unlikely. In addition, when specifically searching for the mass trace of the [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) in LC-MS, the compound could also be detected in samples of ALM F30 described in Ref. 2.

To the best of our knowledge, this is the first report on the occurrence of Pyr as a constituent of fungal peptides in nature. Literature search did not reveal any previous

publications regarding the isolation of peptide-bound Pyr from a fungal source. Pyr is rather widespread as an N-terminal constituent of peptides obtained from bacteria, plants, vertebrates and invertebrates. For example, the enzymatic production of Pyr by thermophilic lactic acid bacteria in Italian cheeses has been described [31,32]. Pyr has been reported as a constituent of antifungal peptides from the bark of *Eucommia ulmoides* [33], as a constituent of an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca of the butterfly *Vanessa cardui* (Lepidoptera, Nymphalidae) [34], in gomesin, a defensive peptide found in the hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana* (Theraphosidae) [35], from the abdominal ganglia of the snail *Aplysia californica* [36], as well as from the hemolymph of the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda) [37]. The N-terminus of neurotensins from the European green frog *Rana ridibunda* also contains a Pyr [38] as does the N-terminus of bradykinin potentiating peptides (BPPs) from the crude venom of the viper *Bothrops jararaca* [39]. Biosynthetically, Pyr peptides originate from glutaminyl peptides by the action of pyroglutamyl cyclases. Currently, more than 100 pyroglutamyl cyclase-type genes can be found in genomic databases such as BLAST (Basic Local Alignment Tool, National Center for Biotechnology Information), including fungal sources. Thus, the possibility of the formation of the truncated peptaibols before extraction can also not be generally ruled out at present. Future studies have to be performed in order to unequivocally prove the origin of the truncated Pyr peptaibols by *T. viride*.

Further confirmation of the identity of [desAA(1-6), Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) and [desPheol] ALM F30 (**8**) may be derived from the so-called sigma<sup>TM</sup> value that represents a calculated parameter based on the true isotopic pattern (TIP<sup>TM</sup>; Bruker Daltonik). It considers

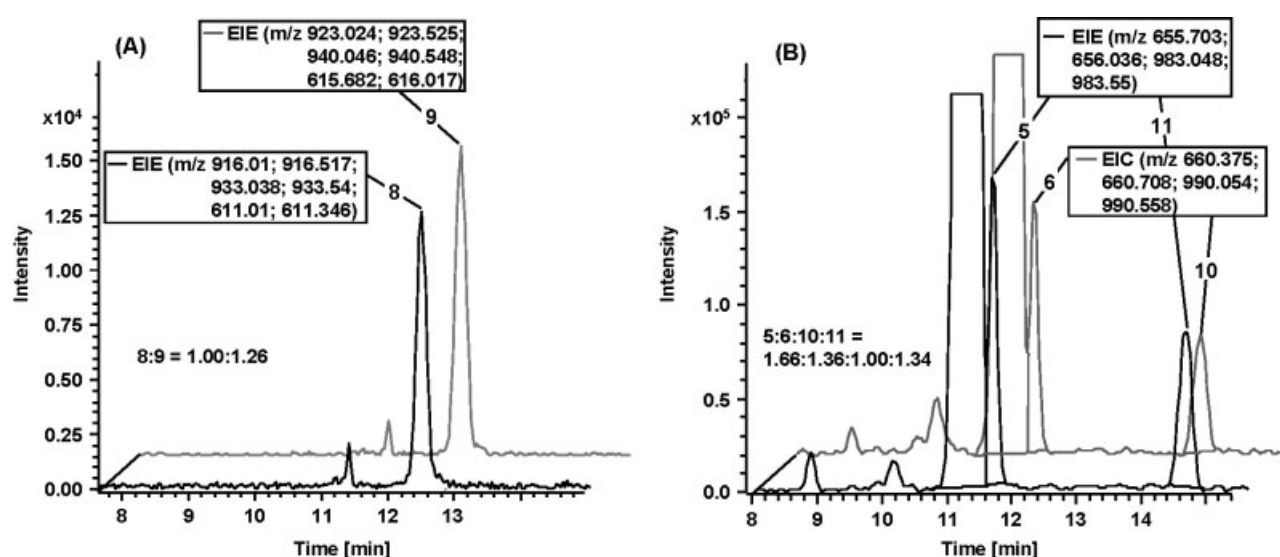
the mass and the relative intensities of all isotopes. For both substances, the calculated elemental composition based on the isotopic pattern of the  $[M + 2H]^{2+}$  ion belongs to the top 10% of possible hits.

The microheterogeneous ALM F30 isolated from a fermentation broth has previously been analyzed by HPLC–MS and 10 components have been identified [2]. Except for one compound (peptaibol F30/6 in Ref. 2 corresponding to [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) in this study) all components possess only one chargeable function with Glu in position 19. Further amino acid exchanges reported in [2] include Val to Aib or Leu in position 9, Leu to Val in position 12 and Aib to Val in position 17 besides the exchange of Ala with Aib in position 6, which was also found for the peptaibols described in the present study. Seven of these peptaibols were not identified by NACE–ESI–IT–MS. However, careful analysis of the ESI–TOF–MS runs revealed that the peptaibols with the sequences AcUPUAUAQUUUGLUPVUUEQFol (F30/1 in Ref. 2) and AcUPUAUAQUVUGVUPVUUEQFol (F30/2 in Ref. 2) apparently comigrate with the major components ALM F30 (**4**) and [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**) in NACE. Other peptaibols identified in Ref. 2 have identical masses as the major components or masses differing by only 14 Da. As described above, a mass difference of 14 Da between peptides of approximately 1950 Da may not always be sufficient to be translated into a separation by CE. Thus, it appears very likely that most of the minor peptaibol components described in Ref. 2 comigrate with the major components of ALM F30 in NACE. Owing to the large excess of the major component, it was not possible to properly select the appropriate precursor ions for amino acid sequence elucidation of comigrating minor components by NACE–ESI–MS<sup>n</sup>.

In contrast, the majority of minor peptaibol components identified by NACE–MS possesses a second carboxy function due to Gln/Glu exchange or loss of the C-terminal Pheol. Except for [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (component F30/6 in Ref. 2), these compounds were not detected in the earlier HPLC–MS study. Apparently, ALM F30 peptaibols possessing only one carboxy function are separated more efficiently by HPLC, while components with two carboxy functions can be analyzed better by NACE. This illustrates the complementarity of both techniques due to their different separation principles.

### Quantification of ALM F30 Components

The relative amounts of the respective peptaibol peptides in a heterogeneous mixture is required in order to judge the relevance of structural variations of individual peptides, in particular, when bioactivities are discussed. In the present NACE assay, the composition cannot be directly obtained from the electropherograms because of the comigration of compounds. Thus, the amount of the identified ALM F30 components in the microheterogeneous mixture was estimated from the NACE–UV traces at 215 nm in combination with the NACE–ESI–TOF–MS results. The relative amount of comigrating or incompletely separated peptides was calculated on the basis of the corrected peak area (peak area divided by the migration time) obtained from the EIE of characteristic isotopic signals of the pseudomolecular  $[M + 2H]^{2+}$  and  $[M + 3H]^{3+}$  ions, while the absolute amount of comigrating peptides was calculated from the corrected peak area obtained from the NACE–UV trace. Only peptide fragments with similar charges and masses were chosen for the relative



**Figure 6** Quantification of (A) [desPheol] ALM F30 (**8**) and [Aib<sup>6</sup>, desPheol], ALM F30 (**9**) and (B) [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**5**), [Aib<sup>6</sup>, Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**6**), [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) and [Aib<sup>6</sup>, Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**10**) by NACE–ESI–TOF–MS. The mass traces shown result from the addition of the unambiguously identified isotope signals of the respective analytes.

quantification, so that comparable ionization yields using ESI can be assumed for the respective analytes. Careful selection of the correct  $m/z$  values is important because signal overlapping by ammonium adducts of comigrating peptides occurs. Figure 6A shows the EIE of [desPheol] ALM F30 (**8**) and [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (**9**). The integration of the peaks resulted in a quantitative relationship of 1.00:1.26. The quantification of the other comigrating substances [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**5**) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**6**) as well as [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**10**) based on the EIE is shown in Figure 6B. Note that the positionally isomeric peptides **5** and **11** form identical pseudomolecular ions as do the positionally isomeric peptides **6** and **10**. The resulting quantitative relationship for these four peptides is 1.66:1.36:1.00:1.34. The relative amount of the pyroglutamyl peptides and of the pair ALM F30 (**4**)/[Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**) was calculated in a similar manner.

The results of the quantitative analysis are listed in Table 1. In accordance with the results obtained by Brückner and coworkers for ALM F30 using HPLC-MS [2], the main components ALM F30 (**4**) and [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**) comprise about 90% of the ALM F30 peptides. The unusual compound [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) was present at a level of about 3% while all other minor components were below 2%. The neutral ALM F50 is transported by the EOF. The quantification of analytes comigrating with the EOF is difficult because of signal quenching by impurities transported by the EOF. Therefore, ALM F50 was not quantified.

## CONCLUSIONS

The components of ALM F30 isolated from fermentations of *T. viride* were analyzed by NACE-ESI-IT-MS and NACE-ESI-TOF-MS. A total of 11 compounds were identified. These are characterized by the well-known Ala/Aib exchange in position 6 as well as additional Gln/Glu exchanges in positions 7 or 19, as well as the loss of the C-terminal Pheol residue. Additionally, two truncated pyroglutamyl derivatives were detected which have not been described for peptaibols from fungal sources before.

Compared to an earlier study on ALM F30 by HPLC-MS [2], the present results are in agreement with regard to the structure and content of the major components ALM F30 and [Aib<sup>6</sup>] ALM F30. However, the discrepancy concerning the minor components is evident. Most of the minor components described in the HPLC study were not detected by NACE-ESI-IT-MS. This may be explained by the fact that the mass differences of  $\pm 14$  Da between compounds in many cases are not sufficient to translate into a separation in CE. On the other hand, most of the compounds

found by NACE-MS were not identified by HPLC-MS. These components are characterized by an additional carboxy group caused by the exchange to Gln *versus* Glu or loss of the C-terminal amino alcohol. Apparently, the additional charge makes such compounds more suitable for CE analysis while they were 'missed' by HPLC. This demonstrates that HPLC and CE are complementary techniques due to the different separation mechanisms. For complete characterization of complex peptide mixtures, both techniques should be applied.

## Acknowledgements

We are indebted to Dr Harald Bocker (Jena) and Prof. em. Dr Detlef Gröger (Halle/Saale) for valuable discussions on the occurrence of pyroglutamic acid in fungal peptides and microbial sources.

## REFERENCES

1. Meyer CE, Reusser F. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* 1967; **23**: 85–86.
2. Kirschbaum J, Krause C, Winzheimer RK, Brückner H. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 799–809.
3. Duclouier H, Wróblewski H. Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues. *J. Membr. Biol.* 2001; **184**: 1–12.
4. Boheim G, Hanke W, Jung G. Alamethicin pore formation: voltage dependent flip-flop of  $\alpha$ -helix dipoles. *Biophys. Struct. Mech.* 1983; **9**: 181–191.
5. Menestrina G, Voges KP, Jung G, Boheim G. Voltage-dependent channel formation by rods of helical polypeptides. *J. Membr. Biol.* 1986; **93**: 111–132.
6. Jung G, Redemann T, Meder S, Hirsch A, Boheim G. Template-free self-assembling fullerene and lipopeptide conjugates of alamethicin form voltage-dependent ion channels of remarkable stability and activity. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 784–798.
7. Whitmore L, Chugh JK, Snook CF, Wallace BA. The peptaibol database: a sequence and structure resource. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 663–665.
8. Degenkolb T, Berg A, Gams W, Schlegel B, Gräfe U. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 666–678.
9. Pandey RC, Cook CJ, Rinehart KL. High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of alamethicins I and II. *J. Am. Chem. Soc.* 1977; **99**: 8469–8483.
10. Schmitt H, Jung G. Total synthesis of the  $\alpha$ -helical eicosapeptide antibiotic alamethicin. *Liebigs Ann. Chem.* 1985; 321–344.
11. Riekkola M-L. Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2002; **23**: 3865–3883.
12. Matysik F-M. Special aspects of detection methodology in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2002; **23**: 400–407.
13. Weinmann W, Maier C, Baumeister K, Przybylski M, Parker CE, Tomer KB. Isolation of hydrophobic lipoproteins in organic solvents by pressure-assisted capillary electrophoresis for subsequent mass spectrometric characterization. *J. Chromatogr.* 1993; **648**: 251–256.
14. Popa TV, Mant CT, Chen Y, Hodges RS. Capillary zone electrophoresis of small  $\alpha$ -helical diastereomeric peptide pairs

PSUREK ET AL.

- with anionic ion-pairing reagents. *J. Chromatogr. A* 2004; **1043**: 113–122.
15. Yang Q, Benson LM, Johnson KL, Naylor S. Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs: on-line-nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999; **38**: 103–121.
  16. Stutz H. Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis* 2005; **26**: 1254–1290.
  17. Nguyen H-H, Imhof D, Kronen M, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U, Gera L, Reissmann S. Synthesis and biological evaluation of analogues of the peptaibol ampullosporin A. *J. Med. Chem.* 2002; **45**: 2781–2787.
  18. Carpino LA, Beyermann M, Wenschuh H, Bienert M. Peptide synthesis via amino acid halides. *Acc. Chem. Res.* 1996; **29**: 268–274.
  19. Roepstorff P, Fohlmann J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984; **11**: 601.
  20. Biemann K. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* 1990; **193**: 886–887.
  21. Rebuffat S, Goulard C, Bodo B. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1995; 1849–1855.
  22. Jaworski A, Brückner H. Sequences of polypeptide antibiotics stilboflavins, natural peptaibol libraries of the mold *Stilbella flavigipes*. *J. Pept. Sci.* 2001; **7**: 433–447.
  23. Jaworski A, Brückner H. Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1999; **862**: 179–189.
  24. Berg A, Grigoriev PA, Degenkolb T, Neuhof T, Härtl A, Schlegel B, Gräfe U. Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276. *J. Pept. Sci.* 2003; **9**: 810–816.
  25. Sharman GJ, Try AC, Williams DH, Ainsworth AM, Beneyto R, Gibson TM, McNicholas C, Renno DV, Robinson N, Wood KA, Wrigley SK. Structural elucidation of XR586, a peptaibol-like antibiotic from *Acremonium persicium*. *Biochem. J.* 1986; **320**: 723–728.
  26. Brückner H, Kripp M, Kieß M. Polypeptide antibiotics trichovirin and trichobrachin: sequence determination and total synthesis. *Chem. Pept. Proteins* 1993; **5/6**: 357–373.
  27. Heinze S, Ritzau M, Ihn W, Schlegel B, Dornberger K, Fleck WF, Zerlin M, Christner C, Gräfe U, Küllertz G, Fischer G. Lipohexin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0096) and *Paecilomyces* sp. (HKI-0055; HKI-0096). I. Screening, isolation and structure elucidation. *J. Antibiotics* 1997; **50**: 379–383.
  28. Christner C, Zerlin M, Gräfe U, Heinze S, Küllertz G, Fischer G. Lipohexin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces* sp. (HKI-0055; HKI-0096). II. Inhibition activity and specificity. *J. Antibiotics* 1997; **50**: 384–389.
  29. Rebuffat S, Goulard C, Hlimi S, Bodo B. Two unprecedented natural Aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: Structures, Membrane modifying and antibacterial properties of pseudokinins KL III and KL VI from the fungus *Trichoderma pseudokoningii*. *J. Pept. Sci.* 2000; **6**: 519–533.
  30. Schiell M, Hofmann J, Kurz M, Schmidt FR, Vertesy L, Vogel M, Wink J, Seibert G. Cephaibols, new peptaibol antibiotics with antihelmintic properties from *Acremonium tubakii* DSM 12774. *J. Antibiotics* 2001; **54**: 220–233.
  31. Mucchetti G, Locci F, Gatti M, Neviani E, Addeo F, Dossena A, Marchelli R. Pyroglutamic acid in cheese: Presence, origin, and correlation with ripening time of grana padano cheese. *J. Dairy Sci.* 2000; **83**: 659–665.
  32. Mucchetti G, Locci F, Massara P, Vitale R, Neviani E. Production of pyroglutamic acid by thermophilic lactic acid bacteria in hard-cooked mini-cheeses. *J. Dairy Sci.* 2002; **85**: 2489–2496.
  33. Huang R-H, Xiang Y, Liu X-Z, Zhang Y, Hu Z, Wang D-C. Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Lett.* 2002; **521**: 87–90.
  34. Köllisch GV, Lorenz MW, Kellner R, Verhaert PD, Hoffmann KH. Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Eur. J. Biochem.* 2000; **267**: 5502–5508.
  35. Silva PI, Daffre S, Bulet P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachylepsin family. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 33464–33470.
  36. Garden RW, Moroz TP, Gleeson JM, Floyd PD, Li L, Rubakhin SS, Sweedler J. Formation of N-pyroglutamyl peptides from N-Glu and N-Gln precursors in *Aplysia* neurons. *J. Neurochem.* 1999; **72**: 676–681.
  37. Destoumieux D, Bulet P, Loew D, Dorsselaer AV, Rodriguez J, Bachère E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 28398–28406.
  38. Desrues L, Tonon M-C, Leprince J, Vaudry H, Conlon JM. Isolation, primary structure, and effects on  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone release of frog neurotensin. *Endocrinology* 1998; **139**: 4140–4146.
  39. Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Portaro FCV, Stöcklin R, de Camargo ACM, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides* 2004; **25**: 1085–1092.

#### 4.4      **Manuskript 4**

Analysis of the lipophilic peptaibol alamethicin by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry

A. Psurek, C. Neusüß, M. Pelzing, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2005, 26, 4368-4378.



4368

Electrophoresis 2005, 26, 4368–4378

Arndt Psurek<sup>1</sup>  
Christian Neusüß<sup>2</sup>  
Matthias Pelzing<sup>2</sup>  
Gerhard K. E. Scriba<sup>1</sup>

## Analysis of the lipophilic peptaibol alamethicin by nonaqueous capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Jena, Germany

<sup>2</sup>Bruker Daltonik, Leipzig, Germany

The microheterogeneous peptaibol alamethicin F30 isolated from the culture broth of *Trichoderma viride* was analyzed by nonaqueous CE-electrospray-MS using an IT and a TOF mass analyzer. Compared to aqueous buffers, higher separation selectivity was observed for methanolic BGE allowing the detection of more minor components. The low electrophoretic mobility observed for neutral analytes under nonaqueous conditions may be explained by ion-dipole interactions between the peptide analytes and electrolyte ions. The amino acid sequences of the individual components were derived from MS<sup>n</sup> using the doubly or triply charged pseudomolecular ions as well as characteristic fragments as precursor ions. The exchange of Ala by  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib) which is frequently observed for peptaibols was detected for several components. Additional variations included the exchange of Gln to Glu, and the loss of the C-terminal amino alcohol or of the first six amino acids from the *N*-terminus with concomitant formation of pyroglutamyl residues. In most cases comigration of the Aib peptaibols with the respective Ala component was observed as the mass difference of 14 Da as the result of the amino acid exchange was not sufficient to translate into an electrophoretic separation under the conditions applied. However, proper selection of the precursor ions allowed the unequivocal analysis of the components. Additional TOF-MS measurements were performed in order to resolve the ammonium adducts from comigrating compounds (i.e., Aib-Ala exchange) and to confirm the amino acid composition of the individual components. Except for neutral compounds migrating close to the EOF the mass accuracy was better than 4 ppm for the doubly charged pseudomolecular ions and better than 2 ppm for triply charged ions.

**Keywords:** Alamethicin F30 /  $\alpha$ -Aminoisobutyric acid / Mass spectrometry / Nonaqueous capillary electrophoresis / Peptaibols / Polypeptide antibiotics / Pyroglutamate

DOI 10.1002/elps.200500387

### 1 Introduction

During the last few years, CE using nonaqueous BGE (so-called nonaqueous CE, NACE) has been increasingly applied and several reviews on this topic have been recently published [1–3]. NACE has proven to be a very useful technique for the separation of hydrophobic compounds and substances which are difficult to separate in aqueous buffers as well as for enantioseparations [4, 5]. Organic solvents offer a potential for separation mechanisms

based on interactions that cannot take place or are too weak in aqueous media. The solubility of many analytes and additives is enhanced in nonaqueous solvents and many analytes are labile in aqueous solutions. Moreover, NACE has advantages when electrochemical detection or ESI-MS is applied [6]. ACN and methanol are frequently used solvents in NACE which possess low surface tension and high volatility. Therefore, these solvents favor the formation of a stable ionization spray especially in sheathless nanoelectrospray MS resulting in strong signals [7]. Despite the fact that only a slight advantage of the organic solvents methanol and ACN compared to water was observed in ESI-MS detection using a sheath-liquid interface [8], the higher separation power for some analytes in NACE is the main reason for the use of nonaqueous solvents in CE.

Traditionally, peptides as hydrophilic compounds are analyzed by aqueous CE. However, beneficial effects of organic solvents on the separation of primarily hydro-

**Correspondence:** Professor Gerhard K. E. Scriba, Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany  
**E-mail:** gerhard.scriba@uni-jena.de  
**Fax:** +49-3641-949802

**Abbreviations:** Aib,  $\alpha$ -aminoisobutyric acid; ALM, alamethicin; ALM F30, alamethicin F30; ALM F50, alamethicin F50; BPE, base peak electropherogram; NACE, nonaqueous CE; pH<sub>app</sub>, apparent pH; Pheol, phenylalaninol; Pyr, pyroglutamic acid

*Electrophoresis* 2005, 26, 4368–4378

phobic peptides in aqueous based CE media have been described. For example, an acidic aqueous buffer containing 20% 2-propanol as organic modifier was used for the separation of isomeric *N*-palmitoylated bradykinin and *O*-palmitoylated gonadorelin as well as for the CE isolation and identification of (cysteinyl-4,5)-palmitoylated peptide SP-C14 [9]. The effect of organic solvents on the migration behavior of peptides has also been investigated [10–12]. Changes in the viscosity of the solvent and the  $pK_a$  values of the analytes affect the migration of the peptides. In addition, modification of the secondary structure of peptides in organic solvents leads to different Stokes radii with consequent changes of the analyte mobilities compared to aqueous systems. The effect of nonaqueous solvents on the dissociation behavior of diastereomeric aspartyl peptides and of the neuropeptides methionine enkephalin and leucine enkephalin has been reported [13]. The separation of enkephalin peptides as anions in the counterelectroosmotic mode could only be achieved by NACE [13, 14]. Lindner's group [15] reported the separation of *N*-protected alanine peptides containing up to six amino acid residues in mixtures of methanol and ethanol with the aid of *tert*-butyl-carbamoylquinine as chiral counterion. The application of online NACE-MS to the analysis of hydrophobic peptides has been demonstrated by Yang *et al.* [16] for the analysis of the antibiotics gramicidin S and bacitracin in ACN/methanol-based BGE systems containing ammonium acetate and formic acid. The use of ESI-MS detection allowed the determination of three minor components in the case of gramicidin S and one minor component in the case of bacitracin.

Alamethicins (ALMs) are 20-residue peptaibols that can be isolated from the culture broth of the mold *Trichoderma viride* [17, 18]. Peptaibols are linear peptides composed of 5–20 amino acids that are biosynthesized exclusively by fungi and contain the nonprotein amino acid  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib or U) and a reduced carboxy terminus [19]. Depending on the fermentation conditions *T. viride* produces neutral alamethicins F50 (ALM F50) or the acidic peptaibols ALM F30 [18]. ALM F50 and ALM F30 possess a phenylalaninol (Pheol) at the C-terminus while the *N*-terminus is acetylated. The compounds differ in the amino acid in position 18 which is the neutral glutamine in the case of ALM F50 and the acidic glutamate residue in the case of ALM F30. Moreover, ALM F30 is a microheterogeneous mixture consisting of two major components differing in the amino acid in position 6, *i.e.*, Ala *versus* Aib, and eight additional minor components [18, 20].

MS, especially ESI or MALDI with quadrupole, IT, or TOF mass analyzers have been proven useful for structural studies of peptaibols [21]. The separation of the individual components of ALM F50 and ALM F30 has been

Analysis of alamethicin peptaibols by NACE-MS 4369

achieved by RP HPLC, the structure of the components has been elucidated by HPLC-ESI-MS/MS [18]. The analysis of peptaibols by CE has not yet been investigated. Therefore, the present study was conducted in order to evaluate the potential of NACE to the analysis of the microheterogeneous ALM F30. Tandem ESI-IT-MS and ESI-TOF-MS were applied for the analysis of the individual components.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Methanol, ACN, and 2-propanol (all HPLC-grade quality), ammonium acetate, sodium hydroxide, and boric acid were purchased from VWR International (Darmstadt, Germany). Ammonium formate and ALM F50 was from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). ALM F30 was isolated from fermentations of *T. viride* strain NRRL 3199 as described previously [18]. Ammonium acetate and ammonium formate were dried overnight in a desiccator over silica before use. The aqueous buffers were prepared in double-distilled, deionized water. Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol was synthesized by solid-phase synthesis according to [22] using the Fmoc strategy for the assembly of the peptide on the solid-support. The Fmoc protected terminating amino alcohol was directly anchored onto the 2-chlorotriyl chloride resin. Activation of the sterically hindered Aib was achieved using tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphate as coupling reagent. The peptide was purified by preparative HPLC and the identity was confirmed by MALDI-MS.

### 2.2 Apparatus

#### 2.2.1 CE

CE with UV detection was performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) equipped with a diode array detector at 25°C using 50  $\mu$ m ID fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with an effective length of 50 cm and a total length of 57 cm. UV detection was carried out at 215 nm at the cathodic end of the capillary. Sample solutions were introduced at the anodic end by hydrodynamic injections at a pressure of 0.5 psi for 3 s.

CE-MS experiments were performed using a Hewlett Packard  $^{3D}$ CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Separations were performed in 50  $\mu$ m ID fused-silica capillaries with a length of 57 cm by application of a separation voltage of 30 kV (sprayer on ground). A pressure of 50 mbar for 4 s was used for sample injection.

For aqueous analyses in CE-UV studies, the capillaries were conditioned by flushing with 0.1 M sodium hydroxide for 30 min, water for 5 min, and the electrolyte solution for 10 min. For NACE experiments new capillaries were conditioned for 30 min with 0.1 M sodium hydroxide, 5 min with water, and 10 min with methanol followed by the separation medium for 10 min. Between the analyses, the capillary was flushed with the respective BGE for 2 min. When not in use, it was washed with the respective solvent and stored in the dry state. The pH and the apparent pH ( $\text{pH}_{\text{app}}$ , in case of the nonaqueous electrolyte solutions) were measured with a WTW pMX 3000 potentiometer (WTW, Weilheim, Germany), equipped with a Schott glass electrode N6180. The electrode was calibrated using aqueous standard pH solutions.

### 2.2.2 ESI-MS

On-line coupling of the CE instrument to the mass spectrometer detector was achieved with an Agilent coaxial sheath-liquid sprayer interface (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The sheath-liquid 2-propanol:water (1:1 v/v) containing 1% formic acid was supplied at a flow rate of 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  by a syringe pump (Cole-Palmer, Vernon Hill, IL, USA). Nebulizer gas pressure was set to 2–3 psi. All ESI-MS experiments were carried out in positive ionization mode at 4500 V.

ESI-IT-MS measurements were performed using an IT mass spectrometer Esquire HCT<sup>™</sup> (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Mass spectra were acquired from  $m/z$  200 to 1500 in the scanning mode and automatic switching between MS and MS/MS. Ions were scanned with a speed of 8300  $m/z$  per s in the MS mode in order to achieve sufficient resolution for charge attribution of the triply charged peptides. The enhanced autoMS/MS settings were optimized to get as many MS/MS spectra over a selected time period as possible. This was achieved by scanning at 26 000  $m/z$  per s and active exclusion after two spectra per mass in a given time window of 0.5 min. MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup> spectra were acquired selecting one (MS<sup>2</sup>) or two (MS<sup>3</sup>) most abundant precursors or by adding preferred masses in the case of follow-up experiments.

ESI-TOF-MS measurements were performed on an orthogonal TOF mass spectrometer micrOTOF<sup>™</sup> (Bruker Daltonik). The mass spectrometer operated in an  $m/z$  range from 200 to 1500.

Data processing has been achieved by DataAnalysis<sup>™</sup> software (Version 3.0; Bruker Daltonik). The peptide MS fragments are labeled according to standard rules [23, 24].

## 3 Results and discussion

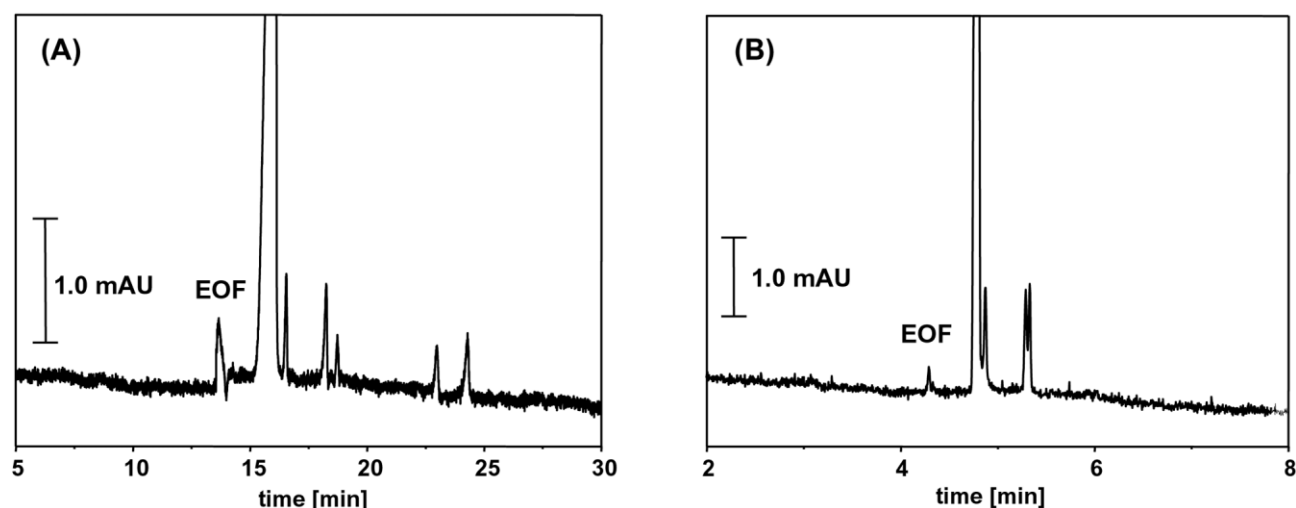
### 3.1 NACE separation of ALM F30 peptaibols

Prior to the CE-MS experiments, the separation of the acidic ALM F30 peptaibols was investigated by CE with UV detection. Methanol, ACN, and mixtures of these solvents, which are frequently used in NACE because of their favorable dielectric constant to viscosity ( $\epsilon/\eta$ ) ratio, were evaluated. In order to ensure deprotonation of the acidic ALM F30 peptides, resulting in an anodic mobility of the analytes, 12.5 mM ammonium carbonate, 12.5 mM ammonium acetate, 12.5 mM ammonium formate, 25 mM ammonium acetate/50 mM ammonia, and 25 mM ammonium acetate/100 mM ammonia were applied as electrolyte systems. The best NACE separation was obtained using 12.5 mM ammonium formate in methanol (the solution has a  $\text{pH}_{\text{app}} = 7.4$ ). In ACN-rich media, *i.e.*, pure ACN and methanol-ACN mixtures, the analyte mobilities observed in the respective electrolyte systems were very low and, therefore, no separation of the components could be achieved. This may be explained by the formation of homo- and/or heteroconjugates of the dissociated Brönsted acids commonly observed with acidic analytes in ACN [25]. The separation under aqueous CE conditions was studied in the pH range 8–12 using 25 mM borate buffers. The best separation was achieved at pH 11. Figure 1 shows a comparison of electropherograms of ALM F30 in aqueous borate buffer, pH 11, compared to a methanol-based electrolyte system containing 12.5 mM ammonium formate. Using the nonaqueous BGE, six compounds were baseline separated compared to four poorly separated peaks in aqueous CE. The analysis time in methanolic electrolytes is much longer compared to the aqueous borate buffer system due to the higher velocity of the EOF in water compared to methanol. The EOF is governed by the different  $\epsilon/\eta$  ratios of the solvents ( $\epsilon/\eta = 98$  for water vs.  $\epsilon/\eta = 60$  for methanol) resulting in a much stronger EOF in water [26–28].

The selectivity advantages observed for the nonaqueous electrolyte systems may be explained by changes in the shape of the peptides in methanol compared to water. Secondary structures like  $\alpha$ -helices or  $\beta$ -sheets are more stable in nonaqueous media because intramolecular forces such as hydrogen bonds and dipole-dipole interactions stabilizing secondary structures are more pronounced in a hydrophobic environment as these forces are thermodynamically favored in nonaqueous media relative to the aqueous systems [29–31].

### 3.2 Migration order of peptaibols

The migration order of the individual components established from the base peak electropherogram (BPE) and selected characteristic fragments is summarized in Fig. 2.



**Figure 1.** Electropherograms of ALM F30 peptaibols by (A) NACE and (B) aqueous CE. Experimental conditions: capillary dimensions, 57/50 cm  $\times$  50  $\mu$ m ID. (A) Running electrolyte, 12.5 mM ammonium formate in methanol, pH<sub>app</sub> 7.4; separation voltage, +30 kV (+10.6  $\mu$ A); (B) running electrolyte, 25 mM aqueous borate buffer pH 11.0; separation voltage, +15 kV (+20.5  $\mu$ A). Concentration of the injected solution in both cases was 1.5 mg/mL ALM F30 dissolved in the respective running electrolyte.

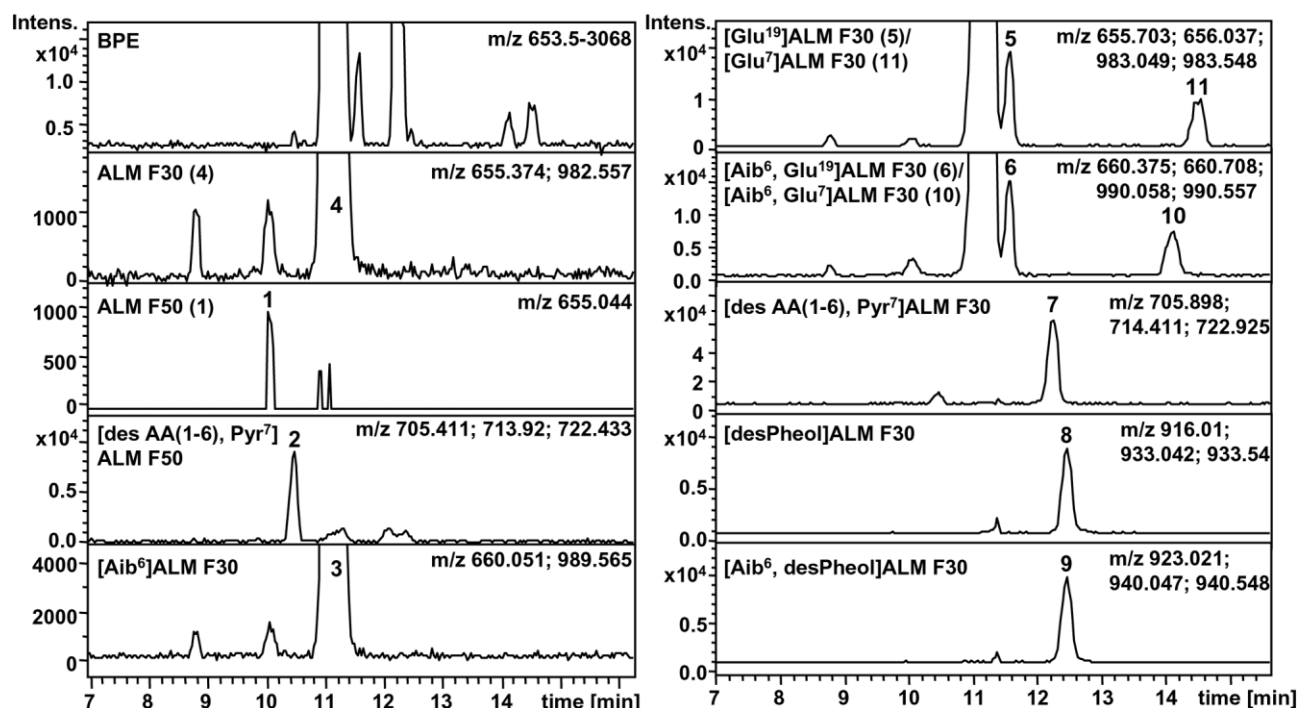
Compared to CE with UV detection, two additional peaks could be detected. Furthermore, MS revealed several comigrating compounds so that, overall, 11 components of ALM F30 isolated from a fermentation broth of *T. viride* were identified in the present study. Table 1 summarizes the ALM F30 peptaibol amino acid sequences identified by NACE-ESI-MS analysis. Details of the mass spectra and examples of the elucidation of the sequences of the individual peptaibols will be discussed in Section 3.3.

With the exception of the neutral peptaibols, ALM F50 (1) and [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (2), all other compounds possess a Glu residue in position 18 which is negatively charged under the experimental conditions applied resulting in an anodic migration of the peptaibols. It is interesting to note that the truncated pyroglutamyl peptaibol [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (2) apparently possesses a low anodic mobility whereas the neutral ALM F50 possesses a low cathodic mobility. This cannot be concluded from the amino acid sequence. In order to confirm the migration behavior of [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (2) in the methanolic BGE a model peptide containing the last five amino acids of the Pyr peptide and a reduced C-terminus, Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Pyr-hexapeptide), was synthesized and subsequently analyzed by NACE. Figure 3 shows the electropherogram of a commercial sample of ALM F50 and the Pyr-hexapeptide in NACE clearly demonstrating a low cathodic mobility of ALM F50 ( $0.45 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) and a low anodic mobility of the Pyr-hexapeptide ( $-0.27 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) compared to

the EOF marker toluene. In aqueous buffers only a single peak could be observed in electropherograms of a mixture of the peptides and toluene, *i.e.*, no mobility of the peptide analytes (data not shown). The low mobilities of the neutral peptides ALM F50 (1) and [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (2) may be explained by ion-dipole interactions between the peptides and buffer ions. Electrostatic interactions are generally stronger in solvents with low dielectric constants [32]. Methanol has a constant of  $\epsilon = 33$  compared to  $\epsilon = 78$  of water. In addition, the dipole character of helical structures like ALM peptides is more pronounced in methanol compared to water [31]. Overall the observed migration behavior of uncharged peptides in methanolic electrolytes demonstrates the analytical power of NACE for peptide separations.

Not considering [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (7) the charged Glu<sup>18</sup> components of ALM F30 can be grouped into pairs characterized by the exchange of Ala by Aib in position 6. Compared to the pair of the parent compound ALM F30 (4) and [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (3) the other pairs are characterized by an additional carboxylic acid group resulting from the exchange of Gln in position 19 to Glu, *i.e.*, [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6), the exchange of Gln to Glu in position 7, *i.e.*, [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (10), or loss of the C-terminal Pheol, *i.e.*, [desPheol] ALM F30 (8) and [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (9). Except for [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (10) which are well separated, the peptaibols of the respective pairs comigrate as the mass difference of





**Figure 2.** BPE and extracted ion electropherogram of all identified peptaibols obtained by NACE-ESI-TOF-MS. Mass traces are based on the  $[M + 2H]^{2+}$  and  $[M + 3H]^{3+}$  ions (see Table 2). Mass traces of substances 2, 7, 8, and 9 are additionally based on the ammonium adduct signals. Peak identity: numbers refer to peptide sequences shown in Table 1.

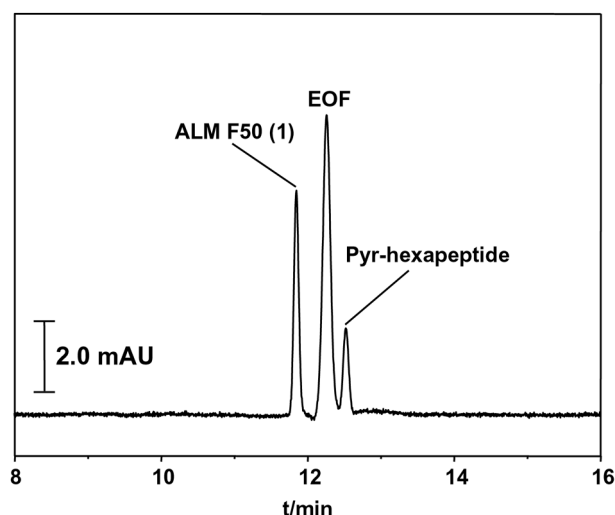
**Table 1.** Amino acid sequences of ALM F30 peptaibols identified by NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup> ( $n = 1–3$ ) and NACE-ESI-TOF-MS

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	ALM F50	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Pheol
2	[des(1–6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F50							Pyr	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	Q	Q	Pheol	
3	[Aib <sup>6</sup> ] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Pheol
4	ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Pheol
5	[Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	E	Pheol
6	[Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	E	Pheol
7	[des(1–6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F30							Pyr	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Pheol	
8	[desPheol] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	A	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	
9	[Aib <sup>6</sup> ,desPheol] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	U	Q	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	
10	[Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	U	E	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Pheol
11	[Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	Ac	U	P	U	A	U	A	E	U	V	U	G	L	U	P	V	U	U	E	Q	Pheol

14 Da caused by the exchange of Ala by Aib is apparently not enough to translate into CE separations of the respective peptaibols with masses of approximately 1950 Da under the experimental conditions applied.

The position of the second carboxylic acid function relative to Glu<sup>18</sup> seems to be important for the migration behavior. If both carboxylic acid groups are “close” to each other as in the case of the Glu<sup>19</sup> and desPheol peptaibols, the respective Ala and Aib peptides comigrate, whereas

in the case of the Glu<sup>7</sup> isomers a separation is achieved. This may be attributed either to differences in the  $pK_a$  values of the Glu side chain carboxylic acid group caused by the microenvironment due to the Ala to Aib exchange. Mathematical models for the calculation of the electrophoretic mobility of peptides also consider the position of charged functions within an amino acid sequence as a reason for different mobilities by the so-called effect of the “position of the center of charge relative to the center of mass” [33].



**Figure 3.** NACE electropherogram of ALM F50 (1) and Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Pyr-hexapeptide) using 12.5 mM ammonium formate in methanol as BGE. Toluene was used as EOF marker. Other experimental conditions as in Fig. 1A.

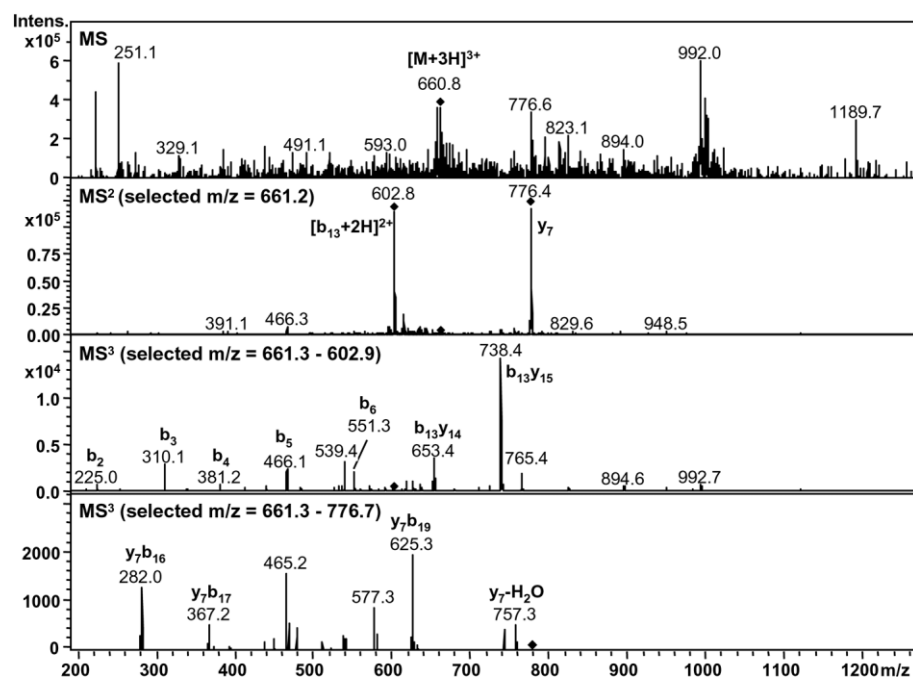
The anodic mobility of the Glu<sup>7</sup> isomers [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (10) is much stronger than the respective Glu<sup>19</sup> peptaibols [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6) although the respective peptaibols have identical masses. Thus, Glu in position 7 leads to an overall higher negative charge of the molecules compared to Glu in position 19 directly adjacent to Glu<sup>18</sup> as the “primary acidic center” of the peptaibols. The desPheol peptides having a second negative charge at the C-terminus which is also close to Glu<sup>18</sup> possess a higher anodic mobility as [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6) due to the higher mass-to-charge ratio caused by the loss of Pheol. An alternative explanation of the mobility differences may be changes of the molecular dipole moments of the ALM peptides. A dipole moment of the ALM F30 (1) peptide backbone of  $55 \pm 1$  D in methanol with a positive partial charge at the N-terminus and a negative partial charge at the C-terminus caused by the acidic Glu<sup>18</sup> residue has been reported [31]. Due to the additional charge closer to the N-terminus Glu<sup>7</sup> isomers should exhibit weaker dipole moments, consequently, resulting in weaker dipole-dipole interactions with the stronger helical peptaibol dipoles such as ALM F30. This may be another reason for the higher anodic mobility of the Glu<sup>7</sup> isomers compared to the Glu<sup>19</sup> components.

### 3.3 NACE-MS

NACE-ESI-MS analysis of ALM F30 was performed using 12.5 mM ammonium formate in methanol as BGE in the positive ionization mode. A sheath-liquid consisting of

1% formic acid in a 1:1 mixture of 1-propanol and water provided a stable spray and the protonation of the peptaibols. Figure 2 shows the BPE ( $m/z$  653.5–3068) and characteristic mass traces (extracted ion electropherograms) of the ALM F30 components obtained by NACE with ESI-TOF-MS detection. ESI results in the formation of doubly and triply charged pseudomolecular ions  $[M + 2H]^{2+}$  and  $[M + 3H]^{3+}$  as well as ammonium adducts. In the case of the peptaibols 2, 7, 8, and 9, the ammonium adducts of the  $[M + 2H]^{2+}$  ion were also selected for the extracted ion electropherograms. Careful selection of ions had to be performed due to the signal overlap of ions resulting from the ammonium adducts of comigrating peaks (see below). Similar BPEs and extracted ion electropherograms were obtained by ESI-IT-MS (data not shown).

The amino acid sequences of the peptaibol ALM F30 components were determined by NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup> in the positive ion mode and compared to published sequences [18]. The doubly charged  $[M + 2H]^{2+}$  or triply charged  $[M + 3H]^{3+}$  ions as well as the subsequently formed  $[b_{13} + 2H]^{2+}$  and  $y_7$  fragments, respectively, served as precursor ions for MS<sup>n</sup>. Figure 4 shows as an example the ESI-IT-MS<sup>n</sup> ( $n = 1–3$ ) spectra of [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6). Precursor ions selected for the MS<sup>2</sup> analysis were the triply charged pseudomolecular ions  $[M + 3H]^{3+}$ . The MS<sup>2</sup> spectrum shows the  $[b_{13} + 2H]^{2+}$  and the  $y_7$  fragment ions resulting by the preferential cleavage of the particularly labile Aib<sup>13</sup>–Pro<sup>14</sup> bond. As described in the literature, this tertiary amide bond undergoes preferential cleavage yielding an N-terminal acylium ion (b-type fragment) and a diprotonated C-terminal ion (y-type fragment) [34]. ESI-MS studies of other peptaibol peptides such as stilboflavins [35], trichotoxins [36], and harzianins [34] displayed similar fragmentation patterns. The MS<sup>3</sup> of the diprotonated  $b_{13}$  fragment ( $[b_{13} + 2H]^{2+}$ ) generated the  $b_2$ – $b_8$  acylium-ion series, as well as the monoprotonated internal fragments  $b_{13}y_{10}$ – $b_{13}y_{17}$ . The C-terminal sequence of [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6) was determined by MS<sup>3</sup> of the  $y_7$  fragment. The resulting internal ion series ( $y_7b_{19}$ ,  $y_7b_{17}$ , and  $y_7b_{16}$ ) are formed by cleavage of C-terminal residues with charge retention at the N-terminus. Loss of water from the  $y_7$  fragment leads to the  $y_7-H_2O$  ion in the MS<sup>3</sup> spectra. The fragmentation of the other ALM F30 components resulted in similar fragment ions and enabled the sequence analysis of all detected peptaibols. Compared to the LC-MS study by Kirschbaum *et al.* [18], the truncated pyroglutamyl peptaibols [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (2) and [des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (7) as well as the peptides [desPheol] ALM F30 (8) and [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (9) represent new components in ALM F30 which were not identified in the previous LC-MS study. The majority of minor peptaibol components identified by NACE-MS



**Figure 4.** ESI-IT-MS<sup>n</sup> ( $n = 1-3$ ) of [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6).

possess a second carboxylic acid function due to Gln-Glu exchange or loss of the C-terminal Pheol. Except for [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11), these compounds were not detected in the earlier HPLC-MS study [18]. Apparently, ALM F30 peptaibols possessing only one carboxylic acid function are separated more efficiently by HPLC while components with two carboxylic acid functions can be analyzed better by NACE. This illustrates that HPLC and CE are complementary techniques due to the different separation mechanism. For complete characterization of micro-heterogeneous peptides it may be advisable to use both techniques.

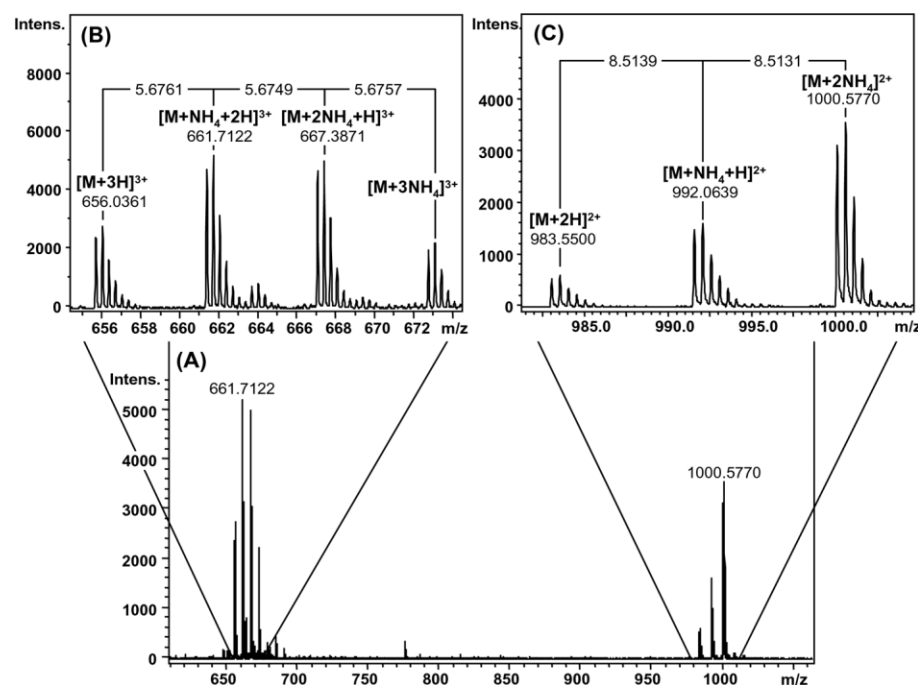
The amino acid sequences of the peptaibols obtained by NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup> were further confirmed by NACE-ESI-TOF-MS analysis. The high resolution of the TOF mass analyzer allowed the detection of the isotopic pattern as shown in the extended mass spectra. The main component ALM F30 (4) was used as mass calibrant. Generally, pseudomolecular ions with double or triple charge were the most abundant ions in the spectra. Fragmentation was not observed. The NACE-ESI-MS system is characterized by a preferential formation of ammonium adducts which can be identified by the mass difference of 8.513 Da for doubly charged species or 5.675 Da for triply charged species relative to the pseudomolecular ion.

The ESI-TOF mass spectrum of [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) shown in Fig. 5 displays two groups of peaks corresponding to the doubly and triply charged pseudomolecular ions with their

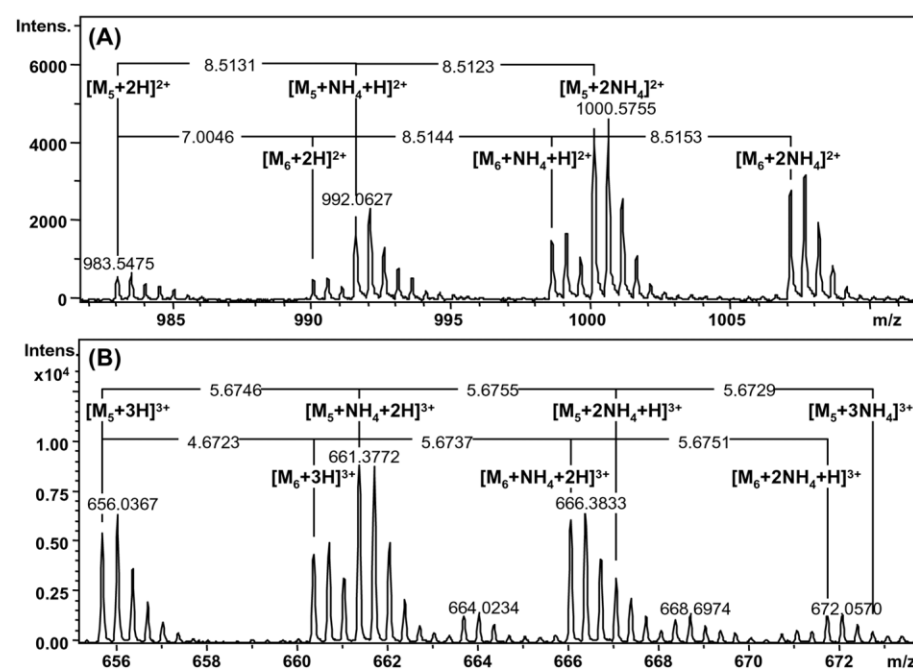
respective mono-, di-, and in case of the  $[M + 3H]^{3+}$  ion also the triammonium adducts. The most abundant peak was the diammonium adduct ( $m/z$  1000.577) in case of the doubly charged pseudomolecular  $[M + 2H]^{2+}$  ion and the monoammonium adduct ( $m/z$  661.712) in case of the triply charged pseudomolecular  $[M + 3H]^{3+}$  ion. This intensity pattern, characterized by the low-abundant pseudomolecular ion and the high abundant  $[M + 2NH_4]^{2+}$  and  $[M + NH_4 + 2H]^{3+}$  ions, was observed for all 19- and 20-residue ALM F30 peptides.

The Ala-Aib amino acid exchange can be recognized by the mass difference of 4.672 Da for triply charged species and 7.008 Da for doubly charged species. Figure 6 illustrates the complexity of the ESI-TOF mass spectra for the comigrating peptides [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6). The formation of ammonium adducts and the Ala-Aib exchange led to a complex set of signals because the ammonium adducts of the pseudomolecular  $[M + 2H]^{2+}$  and  $[M + 3H]^{3+}$  ions of [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5) overlap with the  $[M + 2H]^{2+}$  and  $[M + 3H]^{3+}$  ions of [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6). *Vice versa*, the accurate mass difference between the individual signals allowed the unequivocal assignment of the ammonium adducts which was not possible by the IT-MS<sup>n</sup> measurements.

The ESI-TOF mass spectrum of [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (7) (Fig. 7) displayed a relatively high abundant ion at  $m/z$  714.411 which represents the monoammonium adduct of the pseudomolecular ion  $[M + 2H]^{2+}$ . A com-



**Figure 5.** ESI-TOF-MS of  $[Glu^7]$  ALM F30 (A) with the enlarged triple charged (B) and double charged (C) pseudomolecular ion  $m/z$  region. Denoted mass differences of  $m/z$  8.513 and  $m/z$  5.675 correspond to the ammonium adduct formation of  $[M+2H]^{2+}$  and  $[M+3H]^{3+}$ , respectively.



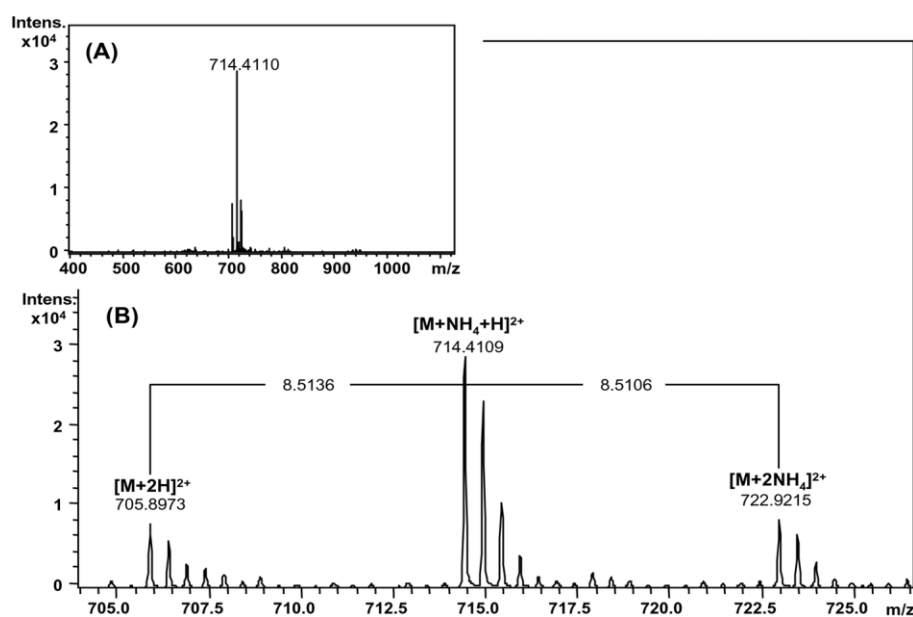
**Figure 6.**  $[M+2H]^{2+}$  (A) and  $[M+3H]^{3+}$   $m/z$  region (B) of the ESI-TOF mass spectrum of the comigrating  $[Glu^{19}]$  ALM F30 (5) and  $[Aib^6, Glu^{19}]$  ALM F30 (6). Denoted mass differences correspond to the Ala/Aib amino acid exchange ( $m/z$  7.008; 4.672) and to the formation of ammonium adducts ( $m/z$  8.513; 5.675).

parable spectrum was observed for  $[desAA(1-6), Pyr^7]$  ALM F30 (2).  $[M+3H]^{3+}$  ions were not observed in the spectra of the truncated pyroglutamyl peptaibols 2 and 7.

Figure 8 shows the isotope pattern of the  $[M+3H]^{3+}$  ion of  $[Aib^6, Glu^7]$  ALM F30 (10) and of the  $[M+2H]^{2+}$  ion of  $[des(1-6), Pyr^7]$  ALM F30 (7) compared to the simulated isotope pattern calculated by the Bruker Data Analysis software. In

both cases the experimental isotope pattern basically matched the calculated isotope pattern confirming the elemental composition of the peptaibol peptides. This approach was applied for the confirmation of the elemental composition of all identified peptides. Table 2 summarizes the monoisotopic  $m/z$  ratios compared to the calculated  $m/z$  values of all compounds. In the case of the truncated pyroglutamyl peptaibols  $[des(1-6), Pyr^7]$  ALM F50 (2) and





**Figure 7.** ESI-TOF-MS of [desAA(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (A) with the enlarged double charged pseudomolecular ion *m/z* region (B). Denoted mass differences of *m/z* 8.513 correspond to the ammonium adduct formation of  $[M + 2H]^{2+}$ .

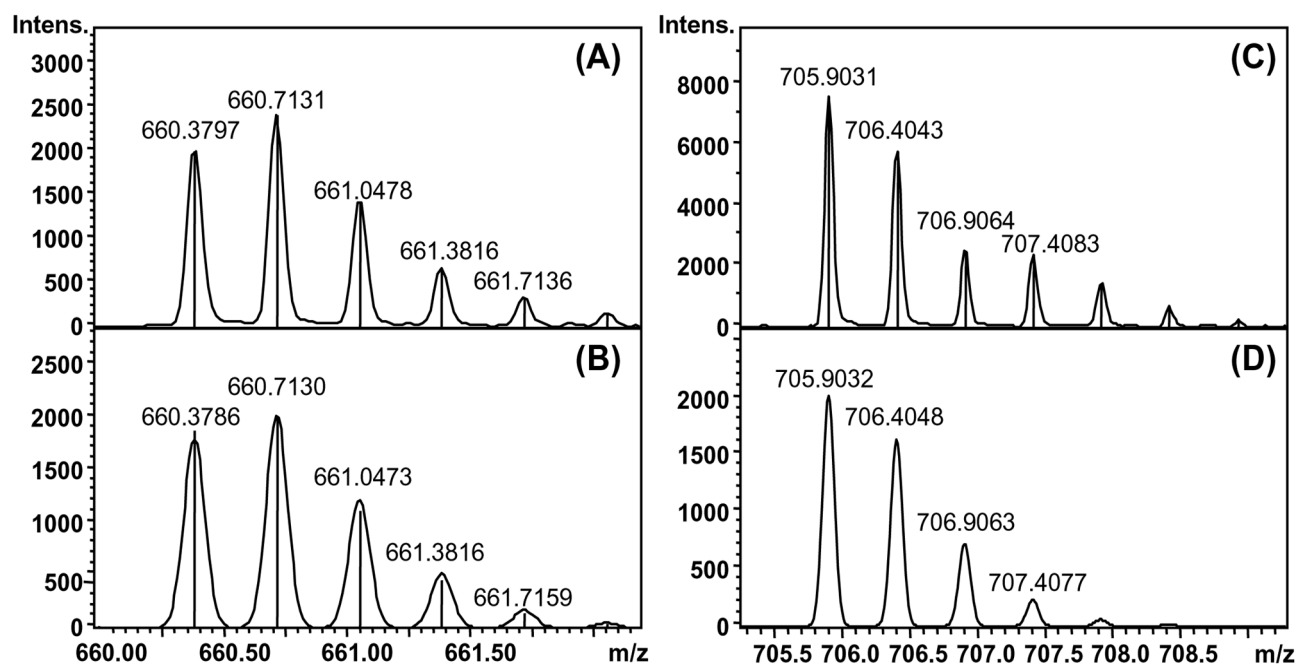
[des(1–6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (7) triply charged pseudomolecular ions were not observed. With the exception of the neutral ALM F50 (1) the mass accuracy was better than 5 ppm for the  $[M + 2H]^{2+}$  ions and better than 2 ppm for the triply charged  $[M + 3H]^{3+}$  ions confirming the elemental composition, *i.e.*, the amino acid composition, of the individual components of ALM F30. The relative low accuracy for ALM F50 (1) may be due to the fact that the relative amount of this compound was very low and, consequently, the corresponding signal intensity was very poor compared to the background noise. However, when utilizing the monoammonium adduct of ALM F50,  $[M + NH_4 + H]^{2+}$  (C<sub>92</sub>H<sub>156</sub>N<sub>24</sub>O<sub>24</sub>), which gives a stronger signal clearly different from the background noise, the difference in mass accuracy was 5.0 ppm.

#### 4 Concluding remarks

The components of microheterogeneous ALM F30 isolated from fermentations of *T. viride* were analyzed by NACE-ESI-IT-MS and NACE-ESI-TOF-MS. The amino acid sequences were identified by MS<sup>n</sup>. Selection of the pseudomolecular ions or characteristic *b*<sub>13</sub> and *y*<sub>7</sub> fragments as precursor ions clearly allowed the analysis of the amino acid sequence also in case of comigrating compounds. The amino acid composition was verified by TOF-MS using the major component ALM F30 as mass calibrant. Differences of only a few ppm between the calculated and experimentally determined molecular masses were observed. Furthermore, the high resolution and mass accuracy of the ESI-TOF meas-

urements enabled a clear distinction between the signals of the ammonium adducts of the pseudomolecular ions and signals of ions of comigrating compounds due to the amino acid exchange Ala-Aib.

A total of 11 compounds were identified which are characterized by the well-known Ala-Aib exchange in position 6 as well as additional Gln-Glu exchanges in positions 7 or 19 or the loss of the C-terminal Pheol. In addition, two truncated pyroglutamyl derivatives were detected. Except for the Ala-Aib exchange, most of these modifications resulted in the introduction of a second charged carboxylic acid group into the molecules. However, not considering the pair [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) and [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (10) the other respective pairs of compounds comigrated as the mass difference of 14 Da caused by the Ala-Aib exchange did not translate into a separation in NACE under the experimental conditions applied. This illustrates the importance of the micro-environment of an amino acid sequence for the dissociation constant of ionizable groups in peptides which leads to differences in the mass to charge ratio resulting in electrophoretic separations. Interestingly, two neutral compounds displayed a low anodic or cathodic electrophoretic mobility under nonaqueous conditions depending on the structure of the analytes. This may be attributed to dipole-dipole interactions between peptides and buffer ions in the organic electrolyte systems and further demonstrate the selectivity differences obtained in CE by the use of organic solvents instead of water. Overall, NACE-MS is a powerful tool for the analysis of lipophilic peptide derivatives such as peptaibols.



**Figure 8.** Measured (A, C) and simulated (B, D) isotope pattern of ALM F30 (A, B) and [desPheol] ALM F30 (C, D).

**Table 2.** Calculated and measured  $m/z$  ratios of the pseudomolecular ions of ALM F30 peptaibols

		$m/z$ monoisotopic mass							
	Molecular formula	Monoisotop. molecular mass, Da	$[M + 2H]^{2+}$		$\Delta m$ , ppm	$[M + 3H]^{3+}$		$\Delta m$ , ppm	
			Measured	Calculated		Measured	Calculated		
1	ALM F50	$C_{92}H_{151}N_{23}O_{24}$	1962.09	982.0784	982.0724	+6.1	655.0483	655.0507	−3.7
2	[des(1–6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F50	$C_{67}H_{108}N_{16}O_{17}$	1408.77	705.4107	705.4112	−0.7	—	—	—
3	[Aib <sup>6</sup> ] ALM F30	$C_{93}H_{152}N_{22}O_{25}$	1977.08	989.5723	989.5722	+0.1	660.0507	660.0506	+0.2
4	ALM F30	$C_{92}H_{150}N_{22}O_{26}$	1963.07	Calibrant	982.5644	—	Calibrant	655.3787	—
5	[Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	$C_{92}H_{149}N_{21}O_{26}$	1964.05	983.0562	983.0564	−0.2	655.7075	655.7067	+1.2
6	[Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	$C_{93}H_{151}N_{21}O_{26}$	1978.06	990.0609	990.0642	−3.3	660.3798	660.3786	+1.8
7	[des(1–6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F30	$C_{67}H_{107}N_{15}O_{18}$	1409.75	705.9031	705.9032	−0.1	—	—	—
8	[desPheol] ALM F30	$C_{83}H_{139}N_{21}O_{25}$	1830.00	916.0177	916.0198	−2.3	611.0148	611.0156	−1.3
9	[Aib <sup>6</sup> ,desPheol] ALM F30	$C_{84}H_{141}N_{21}O_{25}$	1844.01	923.0305	923.0276	+3.1	615.6873	615.6875	−0.3
10	[Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	$C_{93}H_{151}N_{21}O_{26}$	1978.06	990.0634	990.0642	−0.8	660.3797	660.3786	+1.7
11	[Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	$C_{92}H_{149}N_{21}O_{26}$	1964.05	983.0557	983.0564	−0.7	655.7066	655.7067	−0.2

The authors gratefully acknowledge the gift of ALM F30 and the valuable comments by Prof. Hans Brückner (Institute of Nutritional Science, University of Giessen, Germany) as well as the assistance during solid phase peptide synthesis by Dr. Diana Imhof (Department of Biochemistry, University of Jena, Germany).

Received May 24, 2005  
Revised June 21, 2005  
Accepted June 28, 2005

## 5 References

- [1] Riekkola, M.-L., Jussila, M., Porras, S. P., Valkó, I. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 155–170.
- [2] Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 2002, 23, 3865–3883.
- [3] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1485–1498.
- [4] Riekkola, M.-L., Siren, H., *Methods Mol. Biol.* 2004, 243, 365–373.
- [5] Lämmerhofer, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1068, 3–30.
- [6] Matysik, F.-M., *Electrophoresis* 2002, 23, 400–407.

4378 A. Psurek et al.

*Electrophoresis* 2005, 26, 4368–4378

- [7] Jussila, M., Sinervo, K., Porras, S. P., Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 2000, 21, 3311–3317.
- [8] Steiner, F., Hassel, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1068, 131–142.
- [9] Weinmann, W., Maier, C., Baumeister, K., Przybylski, M., Parker, C. E., Tomer, K. B., *J. Chromatogr.* 1993, 648, 251–256.
- [10] Castagnola, M., Cassiano, L., Messina, I., Paci, M., Rossetti, D. V., Giardina, B., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 271–281.
- [11] Idei, M., Kiss, E., Dobos, Z., Hallgas, B., Mészáros, G., Hollosy, F., Kéri, G., *Electrophoresis* 2003, 24, 829–833.
- [12] Yang, Y., Boysen, R. I., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1043, 81–89.
- [13] Psurek, A., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 765–773.
- [14] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 4333–4340.
- [15] Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Electrophoresis* 2002, 23, 1887–1899.
- [16] Yang, Q., Benson, L. M., Johnson, K. L., Naylor, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 103–121.
- [17] Meyer, C. E., Reusser, F., *Experientia* 1967, 23, 85–86.
- [18] Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R. K., Brückner, H., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 799–809.
- [19] Whitmore, L., Chugh, J. K., Snook, C. F., Wallace, B. A., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 663–665.
- [20] Pandey, R. C., Cook, C. J., Rinehart, K. L., *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 8469–8483.
- [21] Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., Gräfe, U., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 666–678.
- [22] Nguyen, H.-H., Imhof, D., Kronen, M., Schlegel, B., Härtl, A., Gräfe, U., Gera, L., Reissmann, S., *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2781–2787.
- [23] Roepstorff, P., Fohlmann, J., *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, 11, 601.
- [24] Biemann, K., *Methods Enzymol.* 1990, 193, 886–887.
- [25] Porras, S. P., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 455–465.
- [26] Valkó, I. E., Sirén, H., Riekkola, M.-L., *J. Microcol. Sep.* 1999, 11, 199–208.
- [27] Steiner, F., Hassel, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3994–4016.
- [28] Geiser, L., Mirgaldi, M., Veuthey, J.-L., *J. Chromatogr. A* 2005, 1068, 75–81.
- [29] Jung, G., Dubischar, N., Leibfritz, D., *Eur. J. Biochem.* 1975, 54, 395–409.
- [30] Nguyen, H.-H., Imhof, D., Kronen, M., Gräfe, U., Reissmann, S., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 714–728.
- [31] Tieleman, D. P., Sansom, M. S. P., Berendsen, H. J. C., *Biophys. J.* 1999, 76, 40–49.
- [32] Bowser, M. T., Kranack, A. R., Chen, D. D. Y., *Trends Anal. Chem.* 1998, 17, 424–434.
- [33] Metral, C. J., Janini, G. M., Muschik, G. M., Issaq, H. J., *J. High Resolut Chromatogr.* 1999, 22, 373–378.
- [34] Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1995, 1849–1855.
- [35] Jaworski, A., Brückner, H., *J. Peptide Sci.* 2001, 7, 433–447.
- [36] Jaworski, A., Brückner, H., *J. Chromatogr. A* 1999, 862, 179–189.

#### 4.5      **Manuskript 5**

Determination of enkephalin peptides by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection

A. Psurek, F.-M. Matysik, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis*, zur Publikation angenommen (Datum der Annahmebestätigung: 31.08.2005).

**Determination of enkephalin peptides by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection**

Arndt Psurek<sup>1</sup>, Frank-Michael Matysik<sup>2</sup>, and Gerhard K. E. Scriba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Jena, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany,

<sup>2</sup>University of Leipzig, Institute of Analytical Chemistry, Linnéstrasse 3, D-04103 Leipzig, Germany.

**Running title:** Determination of enkephalin peptides by NACE-ED

**Correspondence:**

Gerhard K. E. Scriba, Ph.D.  
School of Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
University of Jena  
Philosophenweg 14  
07743 Jena, Germany  
**E-mail:** gerhard.scriba@uni-jena.de  
**Fax:** + 49 - 3641 - 949802

Dedicated to Prof. Dr. B. Radola on the occasion of his 75<sup>th</sup> birthday and his merits regarding Electrophoresis

**Abbreviations:** **CBIA**, capillary batch injection analysis; **ED**, electrochemical detection; **IS**, internal standard; **LE**, leucine enkephalin; **LOD**, limit of detection; **ME**, methionine enkephalin; **NACE**, nonaqueous capillary electrophoresis; **PEG**, poly(ethylene glycol).

**Key words:** Enkephalin peptides / Nonaqueous capillary electrophoresis / Electrochemical detection / Poly(ethylene glycol) / Capillary coating

## Summary

Nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection (NACE-ED) was applied to the analysis of enkephalin peptides. The effect of different buffer compositions on the electrophoretic behavior of methionine enkephalin, leucine enkephalin and [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin was studied. Separation of the protonated and the deprotonated peptides was obtained using acetonitrile/methanol-based electrolyte systems. The electrochemical behavior of the enkephalins was studied by the capillary batch injection analysis technique. NACE-ED yielded well defined signals in the oxidation mode only for the negatively charged analytes. The optimized background electrolyte for the counterelectroosmotic separation consisted of 10 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol (3:1, v/v). Using a platinum microdisk electrode set to an actual potential of + 0.65 V detection limits in the sub-micromolar range were observed which are about one order of magnitude lower compared to UV detection. Problems concerning electroosmotic flow (EOF) instability and electrode fouling caused by water and other neutral sample impurities transported by the EOF can be avoided in the EOF-inverted mode using poly(ethylene glycol)-coated capillaries and an actual working electrode potential of + 1.0 V. For the quantification of the enkephalins [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin was used as internal standard. The practical utility for the determination of enkephalins in spiked plasma samples after solid phase extraction was demonstrated.

## 1 Introduction

The advantages of nonaqueous solvents in capillary electrophoresis (CE) with regard to separation selectivity, analysis time and analyte resolution have been described in a number of recent publications [1-5]. Nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) allows the separation of analytes which have quite similar electrophoretic mobilities in water-based electrolytes. Compared to aqueous media, nonaqueous solvents offer a wider range of dielectric constants, polarity, viscosity and autoprotolysis constants.

NACE has been successfully applied to the analysis of peptides. The advantages of nonaqueous solvents for CE-ESI-MS detection of the antibiotic cyclopeptides bacitracin and gramicidin S have been described by Yang et al. [6]. The Ala-Phe diastereomers were successfully separated using 25 mM ammonium acetate and 1M acetic acid in acetonitrile/methanol (1:1, v/v) [7]. Chiral NACE separations of N-protected alanine peptides using *tert*-butylcarbamoylequinine as chiral counter ion has been reported by Czerwenka et al. [8]. Furthermore, the dissociation behavior of the diastereomeric aspartyl peptides  $\alpha$ -DL-Asp-L-PheOMe and  $\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe and of the neuropeptides methionine enkephalin and leucine enkephalin has been investigated [9]. Anionic enkephalins analyzed in the counterelectroosmotic mode could be separated only in nonaqueous buffer systems [9-11]. So far, UV detection and mass spectrometric detection are the predominantly detection techniques for peptide analysis in NACE.

As an alternative, amperometric detection in combination with NACE offers some attractive features. The higher impedance of the organic solvents reduces undesirable effects of the high voltage on the electrochemical detection circuit and simple detector configurations without a decoupler can be employed. End column detection without capillary modifications or capillary interruptions have been performed using 75  $\mu$ m I.D. capillaries [12]. In addition, acetonitrile-based buffer systems offer a considerable extension of the useful potential range for amperometric detection [13]. NACE with electrochemical detection (NACE-ED) was applied to the determination of amphetamine-type illicit drugs [14], nicotine in tobacco samples [15] and to the forensic analysis of cannabinoids in hair [16].

The determination of peptides by capillary electrophoresis with electrochemical detection (CE-ED) in aqueous background electrolytes has been described [17–22] but the analysis of peptides by means of NACE-ED has not yet been reported. Thus, the present study was conducted in order to investigate the potential of NACE-ED for the analysis of peptides using methionine enkephalin (ME) and leucine enkephalin (LE) as model peptides.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals

Leucine enkephalin (LE), methionine enkephalin (ME) and [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin were purchased from Bachem AG (Heidelberg, Germany). Methanol, acetonitrile (HPLC grade), acetic acid, formic acid, trifluoroacetic acid (TFA), ammonium acetate and tris(hydroxy-methyl) aminomethane (Tris) were from VWR International (Darmstadt, Germany). Lithium acetate was from Sigma-Aldrich

GmbH (Steinhilber, Germany). All buffer reagents were of the highest purity commercially available. 1 ml disposable solid phase extraction tubes packed with 100 mg Discovery DSC-18 SPE sorbent from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were used with a vacuum manifold equipped for twelve cartridges (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

## **2.2 Apparatus and equipment**

### **2.2.1 CBIA-ED**

Capillary batch injection analysis (CBIA) in conjunction with electrochemical detection was performed using a laboratory-made device which is described in detail by Backofen et al. [23]. Convection in the detection cell was accomplished by a rotating cylinder. The nanoliter samples were handled by means of a 100  $\mu\text{m}$  I.D. fused silica capillary (Polymicro Technologies, USA) connected to a 10.0  $\mu\text{l}$  syringe (Hamilton, Switzerland). A microprocessor-assisted device was used to drive the plunger of the syringe to ensure reproducible sample injections in the range of nL-volumes.

### **2.2.2 NACE-UV**

Fused-silica capillaries used for the CE experiments, 75  $\mu\text{m}$  I.D. x 360  $\mu\text{m}$  O.D. or 50  $\mu\text{m}$  I.D. x 360  $\mu\text{m}$  O.D., were obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). New fused-silica capillaries were rinsed for 30 min with 0.1 M aqueous sodium hydroxide, 5 min with water and 5 min with the respective solvent followed by the separation buffer for 10 min. Poly(ethylene glycol) (PEG)-coated capillaries (PE-1M-100), 75  $\mu\text{m}$  I.D. x 360  $\mu\text{m}$  O.D., which were produced according to a static coating method described by Belder et al. [24] using branched PEG coating material from Innophase Corp. (Westbrook, CT, USA) were purchased from CS-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Germany). New PEG-coated capillaries were flushed with water for 5 min and with the respective organic solvent for 5 min followed by the background electrolyte for 5 min. 3 to 4 mm of the coating was removed from each end of the capillary using a heating wire.

NACE-UV experiments were performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument equipped with a diode array detector (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) set to 215 nm. Sample solutions were introduced hydrodynamically at a pressure of 3447.4 Pa (0.5 psi) for 3 s (separation selectivity optimization experiments, section 3.1) or for 4.2 s resulting in an injection volume of 49 nL (comparison between ED and UV detection, section 3.4).

### **2.2.3 NACE-ED**

The electrochemical cell for CE end-column amperometric detection has been described in detail elsewhere [15]. Briefly, the detector cell consists of a cylindrical PTFE body and includes the working electrode, a platinum counter electrode as well as a silver/silver chloride reference system. The internal filling of the reference electrode body was 10 mM sodium acetate and 1 M acetic acid in acetonitrile. All potentials were measured with respect to this reference system. In the presence of a



high voltage of + 25 kV a shift of the working electrode potential of about 300 mV towards more negative potentials occurred that had to be taken into consideration for suitable potential settings [12]. The working electrode was a platinum microdisk electrode with a disk diameter of 60  $\mu\text{m}$ . The capillary-to-electrode distance was set equal to the internal diameter of the capillary (i.e., 75  $\mu\text{m}$ ) which leads to minimized band broadening [25]. No electrical field decoupler was incorporated into the detector arrangement. The detector cell was placed in a Faraday cage.

The high voltage supply (Modell HCN 7E-35000, F.u.G Elektronik, Rosenheim-Langenpfunzen, Germany) was capable of delivering separation voltages up to + 35 kV. Injections were performed hydrostatically by elevating the sample 10 cm for 10 s. According to capillary flow injection measurements carried out with the same system an injection volume of 49 nL was determined by calibration.

All electrochemical measurements were performed in the three-electrode mode using a voltammetric analyzer Modell Autolab PGSTAT10 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) equipped with a low current amplifier module ECD system. Before starting a new analysis a working potential of + 3.0 V was applied for 5 s followed by – 0.5 V for 5 s to ensure long-term stability of the detector response.

NACE-ED experiments in the EOF-inverted mode using PEG-coated capillaries were performed on a PrinCE 60/50 CE system (Prince Technologies B. V., Emmen, The Netherlands) with reversed polarity of the applied voltage. Electrochemical detection was carried out using a BAS LC-4CE amperometric detector (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) interfaced to the data acquisition software by a Lambda 1010 system controller (Bischoff, Leonberg, Germany). The detection cell used for these experiments was the same as described above. System control, data acquisition and data evaluation were carried out with WinPrinCE software.

## 2.2 Sample clean up procedure

Plasma samples (1 ml) containing the enkephalin peptides were mixed with 50  $\mu\text{l}$  of 112  $\mu\text{M}$  of an aqueous solution of [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin as internal standard, 2 ml of acetonitrile and 200  $\mu\text{l}$  1 N hydrochloric acid for protein precipitation and the mixture was centrifuged at 60.000 rpm (350.000 g) for 90 min. The supernatant was dried under a gentle stream of nitrogen for acetonitrile evaporation, lyophilized and redissolved in 1 ml 0.04% TFA in water. The SPE column was activated and equilibrated using 0.5 ml methanol and 0.5 ml 0.04% TFA in water before the sample was applied. After rinsing the column with 0.5 ml acetonitrile/0.04% TFA in water (5/95, v/v) the analytes were eluted with 2 ml of acetonitrile/0.04% TFA in water (45/55, v/v). The extract was dried under a stream of nitrogen and reconstituted in acetonitrile/methanol (3:1, v/v) for injection.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Optimization of the separation selectivity using bare fused-silica capillaries

Acetonitrile exhibits ideal physicochemical properties for electrochemical measurements due to the extended accessible potential range and the enhanced stability of electrochemical responses [12]. However, a background electrolyte based on pure acetonitrile was not considered because of the poor solubility of the enkephalins in this solvent. Mixtures of acetonitrile and methanol which are widely used in NACE show high UV transparency and  $\epsilon/\eta$  ratios making such mixtures convenient media for NACE separations. On the other hand, methanol concentrations should be minimized for sensitive electrochemical detection since the compound can be oxidized and, thus, increase the background current.

The effect of the composition of acetonitrile/methanol mixtures on the separation selectivity of the enkephalins was investigated using the following three fixed electrolyte systems: 25 mM ammonium acetate/1 M acetic acid, and 25 mM ammonium acetate/0.5 M formic acid dissolved in the respective solvent system as acidic electrolyte systems for the analysis of the peptides as protonated, positively charged species and 25 mM ammonium acetate dissolved in the respective solvent systems as electrolyte for the separation of the peptides as deprotonated, negatively charged species. Representative electropherograms of ME, LE and the internal standard [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin (IS) in different running buffers are shown in Figure 1. Table 1 summarizes the mobilities and the separation efficiencies of the NACE analysis of ME and LE using the three electrolyte systems in different acetonitrile/methanol mixtures. The best resolution of the positively charged analytes was obtained in 100% methanol containing 25 mM ammonium acetate and 1 M acetic acid (Figure 1A). The fastest separation of ME, LE and IS, as well as the highest number of theoretical plates per meter were obtained in acetonitrile/methanol (1:1, v/v) using the same electrolyte system. Upon increasing the acetonitrile concentration the effective mobilities of the protonated peptides decreased (Table 1, Figures 1B, C). Two mechanisms affect the mobility of the analytes in opposite ways. The addition of the weak basic dipolar aprotic solvent acetonitrile affects the analyte acid-base equilibria and, therefore, the peptides are only slightly protonated at higher acetonitrile concentrations. In addition, homoconjugation and heteroconjugation phenomena are more pronounced in acetonitrile-rich media which also decrease the analyte mobility. On the other hand, in acetonitrile-rich electrolytes the effective mobility of the analytes and the electroosmotic velocity increase due to higher  $\epsilon/\eta$  ratios. At higher acetonitrile concentrations the effects on the acid-base equilibria and the homo- and heteroconjugation phenomena dominate resulting in decreased overall mobilities. The resolution and the separation selectivity using the more acidic, formic acid-containing buffers was less affected by the solvent system (Table 1, Figure 1C).

The separation of deprotonated, negatively charged ME and LE is not possible using aqueous background electrolytes [10, 11]. In contrast, the counterelectroosmotic separation of the deprotonated peptides using 25 mM ammonium acetate without the addition of acetic acid or formic acid succeeded in all acetonitrile/methanol mixtures containing up to 75% acetonitrile (Figure 1D). The highest selectivity coefficient ( $r$ ) and the highest number of theoretical plates per meter ( $N/m$ ) were obtained in acetonitrile/methanol (3:1, v/v) (Table 1). In contrast to the acidic running buffers, the effective mobility

of the analytes increased with increasing acetonitrile concentrations due to the higher  $\epsilon/\eta$  ratios. In addition, deprotonation of the peptides is favored in solvent mixtures with a high content of acetonitrile. The separation of ME and LE in bare fused-silica capillaries in the counterelectroosmotic mode could not be achieved using 25 mM ammonium acetate in 100% methanol due to the poor EOF velocity and low analyte mobility in methanolic electrolytes (Table 1).

### 3.2 Coelectroosmotic separation using poly(ethylene glycol)-coated capillaries

As will be discussed in section 3.4, electrochemical detection could only be performed for the deprotonated peptides. With regard to the analysis of biological samples a coelectroosmotic separation seems desirable as uncharged sample impurities transported by the EOF, e. g. water, could lead to fouling of the detector electrode. Migration of the anionic enkephalins before the EOF avoids these problems. Reversal of the EOF in NACE has been observed for PEG-coated capillaries in methanol- and acetonitrile-based electrolytes due to the complexation of cations by the PEG coating [24, 26]. The degree of complexation of the cations correlates with the EOF velocity. In addition, the reproducibility of the EOF using nonaqueous electrolytes in PEG-coated capillaries was clearly superior compared to untreated fused-silica capillaries over a long period of time (> 100 runs). Moreover, complex rinsing steps are not required [27].

Baseline separation of the deprotonated enkephalin peptides could be achieved in PEG-coated capillaries using 10 mM lithium acetate/50 mM acetic acid in acetonitrile/methanol (3:1, v/v). Compared to bare fused-silica capillaries, a higher selectivity coefficient for the separation of the deprotonated ME and LE was observed ( $r_{\max} = 1.31$  in PEG-coated capillaries versus  $r_{\max} = 1.14$  in bare fused-silica capillaries). A baseline separation of the deprotonated enkephalin peptides in the PEG-coated capillaries using 25 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol (3:1, v/v), which showed the highest selectivity for the enkephalin separation in bare fused-silica capillaries (see section 3.1), could not be achieved. The high anodic EOF velocity, which is due to the high degree of complexation of ammonium cations by the PEG coating, reduced the time for the separation of the analytes. A reduction of the electroosmotic velocity can be achieved by background electrolyte cations, which exhibit a lower degree of complexation by the PEG coating, for example lithium ions [26]. Thus, lithium acetate buffer systems in acetonitrile/methanol (3:1, v/v) were used for the analysis of the peptides in the PEG-coated capillaries.

### 3.3 Capillary batch injection analysis measurements

Capillary batch injection analysis (CBIA) in conjunction with ED is a convenient way to characterize the electrochemical behavior of analytes and detector characteristics. The methodology is based on the injection of nL sample volumes onto the surface of the sensing electrode which leads to transient, peak shaped signals. Less sample quantities are required compared to cyclic voltammetry which is usually applied to study the electrochemical behavior of analytes. Reproducibility of the response, electrode conditioning procedures and the optimization of the detection potential can easily be investigated [23].

Figure 2A shows a typical recording of the electrochemical response of the oxidation upon injections of 172 nL of 49  $\mu\text{M}$  LE. The hydrodynamic voltammograms of ME and LE which display the dependency of the peak current on the detection potential as obtained by CBIA-ED are shown in Figure 2B. Both peptides undergo electrochemical oxidation at potentials above + 0.60 V. The response increased rapidly as the applied potential increased from + 1.20 V to + 1.80 V. At the same time, the baseline current and the noise level increased as well. Based on the analysis of the signal-to-noise ratio and the reproducibility of the response at different detection potentials, + 1.40 V appears to be an appropriate detection potential for batch injection analysis of these peptides. The amperometric behavior characterized by CBIA-ED was confirmed by NACE-ED but it is generally more efficient to study the hydrodynamic electrochemistry by CBIA.

### 3.4 Electrochemical detection of enkephalin peptides in NACE

Acidic buffer systems leading to coelectroosmotic separations of the peptides in unmodified capillaries resulted only in NACE-ED signals with poor response characteristics. However, well defined signals were obtained in the oxidation mode for counterelectroosmotic separations of the negatively charged analytes. 25 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol (3:1, v/v) enabled the sensitive and reproducible detection by NACE-ED. The analysis of LE in the low  $\mu\text{M}$  concentration range by aqueous CE-ED using a carbon fiber electrode has also been accomplished only in the counterelectroosmotic mode using an alkaline electrolyte system [17]. It may be speculated that the ionization state of the enkephalin peptides is important for sensitive electrochemical detection in CE. An alternative explanation may be the increase of the oxidation potential of tyrosine with decreasing pH as described for aqueous electrolyte solutions [28].

With regard to the concentration of the electrolytes on the detection performance a decrease of the electrolyte concentration generally increased the EOF leading to faster analysis times in bare fused-silica capillaries. Moreover, a lower baseline noise was observed due to reduced interferences of the electrophoretic current with the detection circuit. Therefore, 10 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol (3:1, v/v) was used for further NACE-ED experiments in untreated fused-silica capillaries.

Based on the analysis of the signal-to-noise ratio at different detection potentials, + 0.65 V was chosen as the detection potential for the NACE-ED. In the present experimental configuration the application of a separation voltage of + 25 kV resulted in a negative shift of the working electrode potential of 300 mV. Consequently, a more positive "virtual" potential setting via the potentiostat is necessary to adjust the desired working electrode potential.

The concentration dependence of the peak current was studied for concentrations ranging from 0.4  $\mu\text{M}$  to 400  $\mu\text{M}$ . Calibration data are summarized in Table 2. Linearity is only ensured in the lower  $\mu\text{M}$  range (< 50  $\mu\text{M}$ ). In the higher  $\mu\text{M}$  range the first detected LE apparently influences the electrode response of ME. This was confirmed by a single injection of 131  $\mu\text{M}$  ME resulting in a higher peak compared to co-injection of both enkephalins.

Figure 3 illustrates the advantages of ED compared to UV detection with regard to the limit of detection (LOD). The LODs for ME and LE are about one order of magnitude lower compared to UV detection (Table 2). The LODs obtained by NACE-ED are comparable to those obtained by aqueous CE-ED when analyzing LE either in the free form (LOD  $\sim 0.98 \mu\text{M}$ ) or as biuret complex in copper(II) containing background electrolytes (LOD  $\sim 0.50 \mu\text{M}$ ) [17]. However, in contrast to aqueous CE-ED the more straightforward decoupler free end-column detection with  $75 \mu\text{m}$  I.D. capillaries can be applied in NACE. Furthermore, a separation of the negatively charged enkephalins in aqueous buffers is not possible [10, 11].

ED of the enkephalins in the deprotonated form in the coelectroosmotic mode can also be performed in PEG-coated capillaries. Figure 4 shows typical NACE-ED electropherograms in of two different concentrations of the enkephalin peptides in the low  $\mu\text{M}$  range obtained in a PEG-coated capillary using a lithium acetate buffer system in acetonitrile/methanol (3:1, v/v). For the detection of the enkephalin peptides in the reversed polarity mode an optimal working electrode potential of  $+1.0 \text{ V}$  was determined based on the analysis of the signal-to-noise ratio. In contrast to the counterelectroosmotic separation the application of  $-20 \text{ kV}$  results in a positive shift of the working electrode potential of  $300 \text{ mV}$ . Therefore, a potential of  $+0.7 \text{ V}$  was selected which corresponds to an actual working electrode potential of  $+1.0 \text{ V}$  in the presence of the high voltage electric field.

### 3.5 Plasma analysis

In a preliminary study NACD-ED was applied to the analysis of the enkephalin peptides in spiked plasma samples. [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin was selected as internal standard to correct for incomplete extraction as well as injection errors and minor fluctuations of the migration times during CE analysis. The compound also exhibits a similar electrochemical behavior as the target analytes. The peptides were isolated by solid phase extraction (SPE) on RP-18 cartridges (for experimental details see section 2.2) resulting in a recovery of at least 75% for the analytes. Using a PEG-coated capillary with  $2 \text{ mM}$  lithium acetate/ $10 \text{ mM}$  acetic acid in acetonitrile/methanol (3:1, v/v) as running electrolyte linear relationships with regression coefficients of  $r \geq 0.9989$  were obtained in concentration range of  $1.2 \mu\text{M}$  to  $8.0 \mu\text{M}$  in the case of LE and from  $1.2 \mu\text{M}$  to  $7.6 \mu\text{M}$  in the case of ME, respectively. Figure 5A shows a typical electropherogram for a plasma sample spiked at a level of about  $4 \mu\text{M}$  with each enkephalin and  $6.2 \mu\text{M}$  of the IS using NACE-ED in the EOF-inverted mode. Compared to ED, UV detection resulted in intensive signals of matrix components (Figure 5B) which were not detected by ED under the experimental conditions applied. A higher selectivity for the analysis of complex matrices such as plasma samples has also been reported for aqueous CE-ED [29-31].

## 4 Concluding remarks

Using ME and LE as model compounds nonaqueous background electrolytes have been applied to CE-ED for the first time. The separation of the peptides could be achieved in untreated fused-silica capillaries using acetonitrile- and methanol-based running electrolytes either as protonated or

deprotonated species. The use of PEG-coated capillaries also allowed the coelectroosmotic separation of the deprotonated peptides using an lithium acetate/acetic acid buffer system in acetonitrile/methanol. The latter conditions appear especially favorable for ED as the compounds migrated before the EOF, therefore, avoiding any influence of neutral analytes on the sensing electrode. ED resulted in LODs for ME and LE about one order of magnitude lower compared to UV detection under otherwise identical experimental conditions. The principal applicability of NACE-ED to bioanalysis of peptides was demonstrated by the analysis of ME and LE in spiked plasma samples upon SPE work-up. [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin was used as internal standard. Although the assay is as sensitive as CE-ED in aqueous background electrolytes [17] the LODs of about 0.3  $\mu\text{M}$  of the present method are not yet sensitive enough to determine *in vivo* levels of the enkephalins which are in the range of 0.02 – 0.15  $\mu\text{M}$  [32, 33]. In order to increase the sensitivity of the method, further optimization of the sample work-up and particularly sample stacking procedures should be carried out.

## 5 Acknowledgements

The financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant no. MA1491/6.1) and the Fonds der Chemischen Industrie is gratefully acknowledged.

## 6 References

- [1] Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 2002, 23, 3865-3883.
- [2] Riekkola, M.-L., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 155-170.
- [3] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 3-11.
- [4] Steiner, F., Hassel, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3994-4016.
- [5] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1485-1498.
- [6] Yang, Q., Benson, L. M., Johnson, K. L., Naylor, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 103-121.
- [7] Hansen, S. H., Bjørnsdottir, I., Tjørnellund, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 49-55.
- [8] Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Electrophoresis* 2002, 23, 1887-1899.
- [9] Psurek, A., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 765-773.
- [10] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 4333-4340.
- [11] Šolínová, V., Kašička, V., Barth, T., Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 9-18.
- [12] Matysik, F.-M., *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 349-354.
- [13] Matysik, F.-M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 2581-2586.
- [14] Backofen, U., Matysik, F.-M., Hoffmann, W., Lunte, C. E., *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 367, 359-363.
- [15] Matysik, F.-M., *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 27-34.
- [16] Backofen, U., Matysik, F.-M., Lunte, C. E., *J. Chromatogr. A* 2002, 942, 259-269.
- [17] Gawron, A., Lunte, S., *Electrophoresis* 2000, 21, 3205-3211.
- [18] Wang, W., Xin, H., Shao, H., Jin, W., *J. Chromatogr. B* 2003, 789, 425-429.
- [19] Voegel, P. D., Baldwin, R. P., *Am. Lab.* 1996, 28, 39-45.
- [20] Ye, J., Baldwin, R. P., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2669-2674.
- [21] Warner, A. M., Weber, S. G., *Anal. Chem.* 1989, 61, 2664-2668.
- [22] Rose, M. J., Lunte, S. M., Carlson, R. G., Stobaugh, J. F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1851-1859.
- [23] Backofen, U., Matysik, F.-M., Hoffmann, W., Ache, H.-J., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 362, 189-193.
- [24] Belder, D., Husmann, H., Warnke, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 666-672.
- [25] Matysik, F.-M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 2581-2586.
- [26] Belder, D., Warnke, J., *Langmuir* 2001, 17, 4962-4966.
- [27] Belder, D., Elke, K., Husmann, H., *J. Microcol. Sep.* 1999, 11, 209-213.
- [28] Sahlin, E., Beisler, A. T., Weber, S. G., Sandberg, M., in: Brajter-Toth, A., Chambers, J. Q. (Eds.), *Electroanalytical Methods for Biological Materials*, Marcel Dekker, Inc., New York 2002, pp. 367-398.
- [29] Holland, L. A., Leigh, A. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3649-3658.
- [30] Baldwin, R. P., *Electrophoresis* 2000, 21, 4017-4028.
- [31] Voegel, P. D., Baldwin, R. P., *Electrophoresis* 1997, 18, 2267-2278.
- [32] Fleming, L. H., Reynolds, N. C., *J. Chromatogr.* 1988, 431, 65-76.
- [33] Smith, T. W., Hughes, J., Kosterlitz, H. W., Sosa, R. P., in: Kosterlitz, H. W. (Ed.), *Opiates and endogenous opioid peptides*, Elsevier Press, Amsterdam 1976, pp. 57-62.

Table 1. Analyte mobilities and separation efficiency of the NACE analysis of methionine enkephalin (ME) and leucine enkephalin (LE) using the three fixed electrolyte systems in methanol (MeOH) and acetonitrile (AN)/MeOH mixtures. The CE operating conditions were the same as in Figure 1.

solvent system	25 mM ammonium acetate, 1M acetic acid					25 mM ammonium acetate, 0.5 M formic acid					25 mM ammonium acetate				
	$\mu^a$ [ $10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]		$R_s^c$	$t_b^d$ [min]	$N/m^e$	$\mu^a$ [ $10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]		$R_s^c$	$t_b^d$ [min]	$N/m^e$	$\mu^a$ [ $10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]		$R_s^c$	$t_b^d$ [min]	$N/m^e$
	EOF	ME				EOF	ME				EOF	ME			
MeOH (100%)	4.38	5.30	1.24	11.2	13.0	410 020	5.63	9.46	9.87	1.04	2.6	8.4	421 413	7.49	-7.86 <sup>f)</sup> 1.02 <sup>f)</sup> 0.9 <sup>f)</sup> -
AN/MeOH (1:3, v/v)	14.93	5.34	6.89	1.29	8.1	6.2	510 718	15.54	11.05	11.63	1.05	4.6	4.8	445 685	21.02 -11.40 -10.40 1.10 6.2 13.3 122.535
AN/MeOH (1:1, v/v)	23.84	3.61	5.09	1.41	6.3	4.6	534 288	23.01	10.82	11.56	1.07	4.0	3.7	331 618	34.38 -13.24 -11.95 1.11 4.8 5.9 133 025
AN/MeOH (3:1, v/v)	31.90	0.97	1.82	1.88	3.5	3.9	496 950	28.93	10.19	10.91	1.07	3.3	3.3	405 443	49.07 -13.30 -11.71 1.14 3.5 3.4 244 728

a) Effective (ME, LE) and electroosmotic (EOF) mobility, respectively.

b) Selectivity coefficient,  $r = \mu_1/\mu_2$ , where  $\mu_1$  and  $\mu_2$  were the effective mobilities of the analytes.

c) Resolution ( $R_s$ ) between LE and ME.  $R_s$  was calculated according to  $R_s = 1.18 (t_2 - t_1) / (W_{0.5/1} + W_{0.5/2})$ , where  $t_1$  and  $t_2$  were the migration times and  $W_{0.5/1}$  and  $W_{0.5/2}$  were the peak width at half peak height of the first and the second peak, respectively.

d) Analysis time

e) Number of theoretical plates per meter for leucine enkephalin, where  $N$  was calculated according to  $N = 5.54 (t_m/W_{0.5})^2$ ,  $t_m$  – migration time,  $W_{0.5}$  – peak width at half peak height.

f) Data obtained in the EOF-inverted mode using the PEG-coated capillary (see section 3.4).

Table 2. Concentration dependence of the peak current for NACE-ED determinations of the enkephalins in bare fused silica capillaries for concentrations ranging from 0.2  $\mu\text{M}$  to 8.0  $\mu\text{M}$  and comparison of the limit of detection (LOD) between NACE-ED and NACE-UV (215 nm). Experimental conditions are specified in Figure 3.

Compound	Slope [ $\text{pA}/\mu\text{M}$ ]	Intercept [ $\text{pA}$ ]	Correlation coefficient ( $n = 10$ )	LOD <sup>a)</sup> (NACE-ED) [ $\mu\text{M}$ ]	LOD <sup>a)</sup> (NACE-UV) [ $\mu\text{M}$ ]
leucine enkephalin	$15.36 \pm 0.31$	$0.99 \pm 1.06$	0.998	0.3	3.3
methionine enkephalin	$16.36 \pm 0.45$	$2.54 \pm 1.51$	0.997	0.3	3.2

a) The LOD was calculated on the basis of a signal-to-noise ratio of 3.



## Figure legends

Figure 1. Influence of the acetonitrile content in acetonitrile/methanol mixtures on the separation of ME, LE and [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin (IS) by NACE using running electrolytes consisting of (A, B) 25 mM ammonium acetate/1M acetic acid, (C) 25 mM ammonium acetate/0.5 M formic acid, and (D) 25 mM ammonium acetate. Experimental conditions: fused-silica capillaries, 47/40 cm x 50 µm I.D.; applied voltage + 25 kV; detection, 215 nm.

Figure 2. Signals for leucine enkephalin obtained by (A) capillary bath injection analysis-electrochemical detection (CBIA-ED) at a detection potential of  $E = + 1.4$  V and (B) hydrodynamic voltammograms for leucine enkephalin and methionine enkephalin obtained by CBIA-ED.  $I$  is the current strength at the peak maximum. Experimental conditions: injection capillary I.D., 100 µm; injection volume, 172 nL; sensing electrode, 60 µm platinum microdisk; background electrolyte, 2 mM lithium acetate/10 mM acetic acid in acetonitrile/methanol (3:1, v/v); analyte concentration, 49 µM; capillary outlet to electrode distance, 60 µm, unstirred electrolyte.

Figure 3. Electropherograms of 4.9 µM LE and 4.7 µM ME obtained by (A) NACE-ED and (B) NACE-UV in bare fused-silica capillaries. Experimental conditions: background electrolyte 10 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol (3:1, v/v); capillary dimensions, (A) 67/60 cm x 75 µm I.D., (B) 68 cm x 75 µm I.D.; applied voltage, + 25 kV (+ 6.2 µA); detection, (A) UV at 215 nm, (B) ED, sensing electrode 60 µm platinum microdisk, detection potential, + 0.65 V. Injection volume, 49 nL in both cases.

Figure 4. NACE-ED electropherograms of the enkephalin peptides using PEG-coated capillaries. Peak identification as in Figure 1. Analyte concentrations: (A) ME, 5.60 µM, LE, 4.73 µM, IS, 5.32 µM and (B) ME, 0.56 µM, LE 0.47 µM, IS 0.53 µM. Experimental conditions: background electrolyte, 2 mM lithium acetate/10 mM acetic acid in acetonitrile/methanol (3:1, v/v); applied voltage, – 20 kV (– 2.1 µA); PEG-coated capillary, 65 cm x 75 µm I.D.; sensing electrode, 60 µm platinum microdisk; detection potential, + 1.0 V.

Figure 5. Comparison of (A) NACE-ED and (B) NACE-UV detection of a plasma sample spiked with 4.5 µM ME, 4.3 µM LE and 6.2 µM IS after sample clean-up by SPE. Experimental conditions: background electrolyte, 2 mM lithium acetate/10 mM acetic acid in acetonitrile/methanol (3:1, v/v); applied voltage, (A) – 20 kV (– 2.1 µA), (B) – 30 kV (– 3.9 µA); PEG-coated capillary, (A) 65 cm x 75 µm I.D., (B) 47/40 cm x 75 µm I.D.; detection, (A) see Figure 4, (B) UV at 215 nm.

Figure 1.

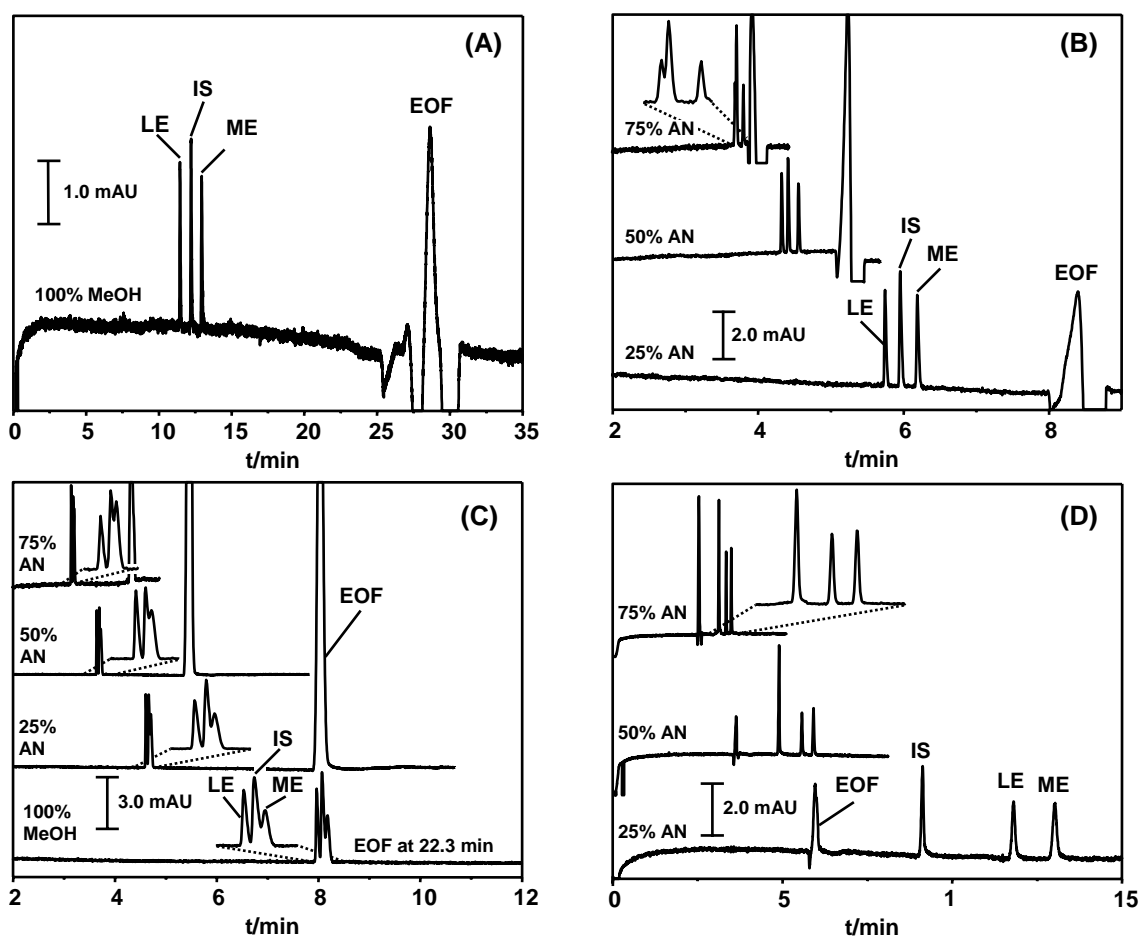


Figure. 2

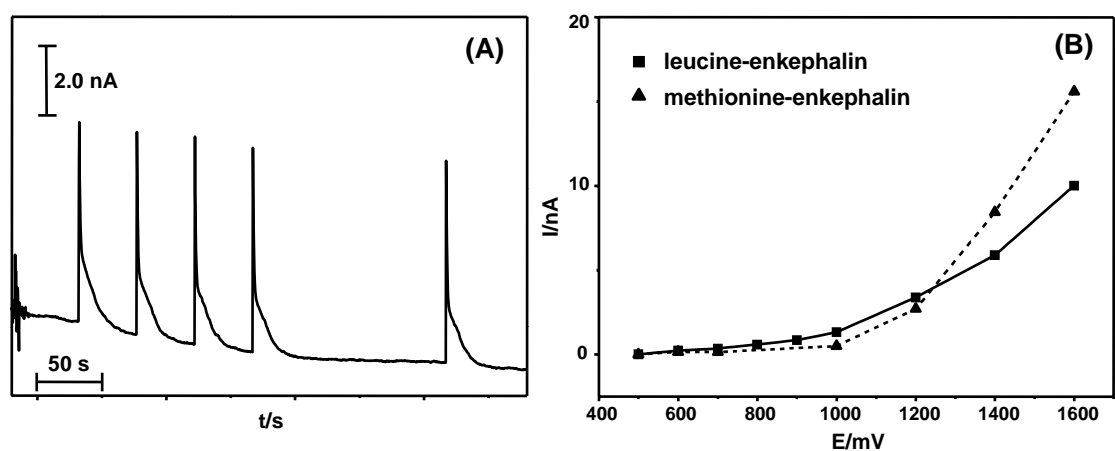


Figure 3.

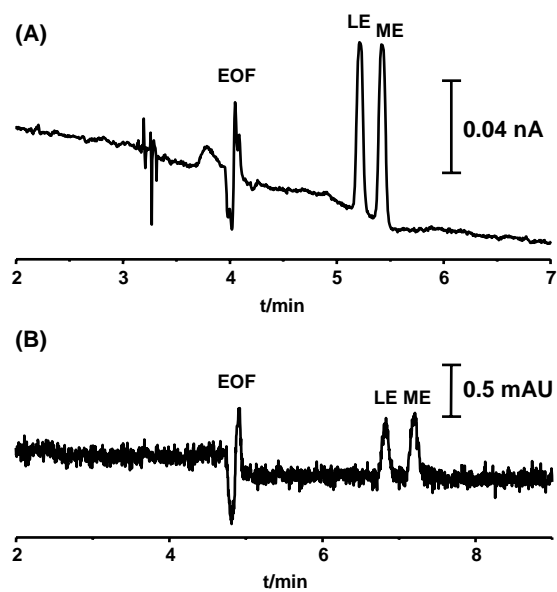
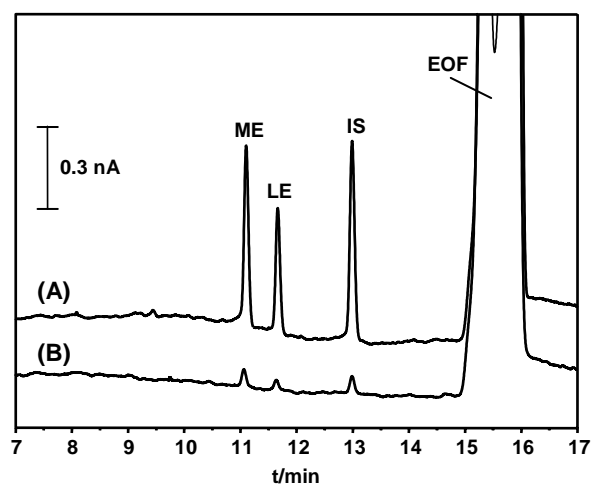
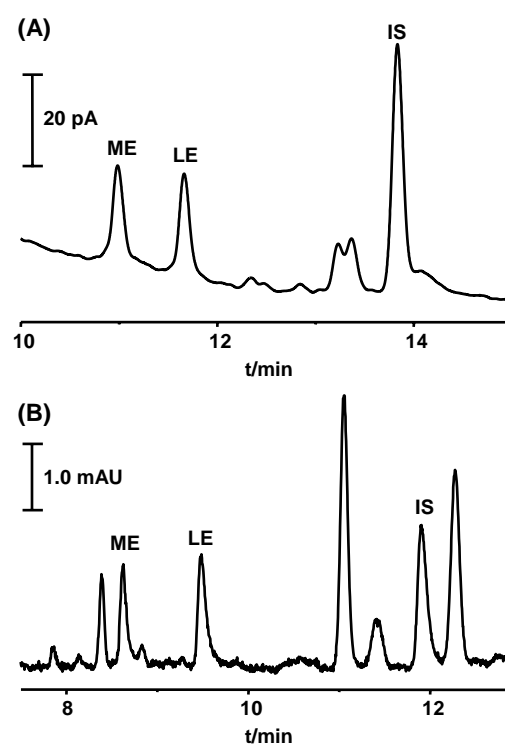


Figure 4.



**Figure 5.**

## 5 Gesamtdiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Peptide mit Hilfe der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese (NACE) analysiert. Es wurden sowohl grundsätzliche, trennmethologische Fragestellungen bearbeitet als auch praktische Anwendungen für die NACE-Analytik von Peptiden entwickelt.

Der Ionisierungsgrad und damit das Migrationsverhalten eines Peptides wird entscheidend durch den pH-Wert des CE-Puffers bestimmt. Da sich das Säure-Base-Verhalten eines Analyten in nichtwässrigen und wässrigen Elektrolytsystemen deutlich unterscheidet, wurden  $pK_a$ -Wert-Bestimmungen für verschiedene kleine Peptide in beiden Medien mit Hilfe der CE durchgeführt (Manuskript 1). Auch die Sekundärstruktur beeinflusst vor allem bei Polypeptiden die Analytmobilität. Da organische Lösungsmittel in der Lage sind die Sekundärstruktur von Peptiden zu beeinflussen, wurde das Migrationsverhalten verschiedener biologisch aktiver,  $\alpha$ -helikaler Polypeptide wie Melittin, Magainin 2, Cecropin P1, verschiedene Ampullosporin A-Derivate und Alamethicin F30 in wässrigen und nichtwässrigen Elektrolytsystemen vergleichend untersucht (Manuskript 2). Die Konformationsänderungen wurden dabei mit Hilfe der CD-Spektroskopie analysiert.

Als Anwendungsbeispiele für den Einsatz der NACE zur Peptidanalytik wurden zwei Applikationen entwickelt. Das mikroheterogene Alamethicin F30, ein Peptaibol-Peptidgemisch mit membranaktiven Eigenschaften, wurde durch NACE-MS-Messungen charakterisiert (Manuskripte 3 und 4). Die Strukturidentifizierung der einzelnen Bestandteile dieser Peptidmischung erfolgte mit Hilfe von ESI- $MS^n$ -Messungen. Durch die Kopplung des NACE-Systems an ein Flugzeitmassenspektrometer (NACE-ESI-TOF-MS) konnten die exakten Molekülmassen der identifizierten Peptide bestimmt und damit die ESI- $MS^n$ -Ergebnisse bestätigt werden. Die Vorteile des Einsatzes nichtwässriger Lösungsmittel für die elektrochemische Detektion (ED) werden in einem zweiten Anwendungsbeispiel dargestellt. Es wurde eine NACE-ED-Methode zur Bestimmung von Enkephalin-Peptiden entwickelt, wobei eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der UV-Detektion erzielt wurde (Manuskript 5).

### 5.1 Effekte des Lösungsmittels auf das Dissoziationsverhalten von Peptiden (Manuskript 1)

#### 5.1.1 $pK_a$ -Wert-Bestimmung

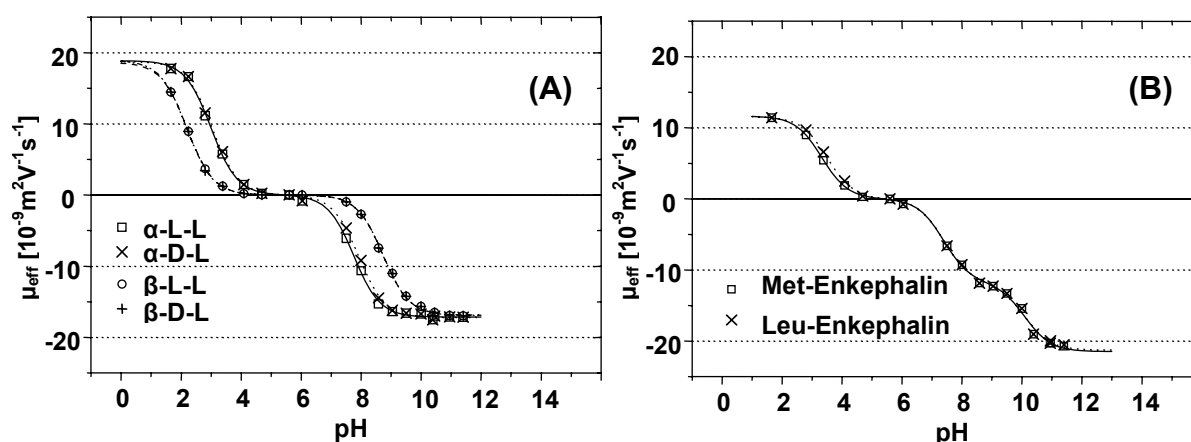
Die  $pK_a$ -Werte verschiedener kleiner Peptide in Methanol, Methanol/Wasser (1:1, v/v) und Wasser wurden mit Hilfe der CE bestimmt, wobei Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und isomere Aspartyl-Dipeptide als Modellsubstanzen verwendet wurden. Es wurde eine Serie von  $\mu_{\text{eff}}$ -Werten bei verschiedenen pH-Werten gemessen und aus den resultierenden sigmoidalen  $\mu_{\text{eff}}$ -pH-Kurven durch nichtlineare Kurvenanpassung die  $pK_a$ -Werte berechnet (vgl. Abschnitt 2.4.1).

Um komplizierte potentiometrische pH-Messungen in nichtwässrigen Lösungen zu vermeiden, wurden die Dissoziationskonstanten ( $pK_a^*$ ) der Peptide in Methanol unter Verwendung der *conventional pH scale* ermittelt (vgl. Abschnitt 2.5.2). Die Herstellung der methanolischen Pufferlösungen erfolgte durch Mischen einer Säure mit bekanntem  $pK_a^*$ -Wert und dem korrespondierenden Natriumsalz. Der *conventional pH* ( $pH^*$ ) dieser Pufferlösungen wurde entsprechend der Henderson-Hasselbalch-

Gleichung berechnet. Zusätzlich wurde der *apparent pH* ( $\text{pH}_{\text{app}}$ ) aller nichtwässrigen Puffer bestimmt, da in den meisten NACE-Publikationen dieser praxisnahe Wert zur Puffercharakterisierung angegeben wird. Die  $\text{pH}_{\text{app}}$ -Bestimmung erfolgte potentiometrisch unter Verwendung einer Glaselektrode, die mit wässrigem Referenzelektrolyt gefüllt war und mit wässrigen pH-Standardpuffern kalibriert wurde. Diese  $\text{pH}_{\text{app}}$ -Werte zeigen allerdings im Vergleich zu den  $\text{pH}^*$ -Werten sehr große Abweichungen von den thermodynamischen pH-Werten und dienen vorzugsweise zur Beschreibung relativer Aciditätsverhältnisse im nichtwässrigen Milieu [101,118]. So weist beispielsweise ein Puffer bestehend aus 25 mM Chloressigsäure ( $\text{pK}_{\text{a}}^* = 7.8$ ) und 25 mM Natriumchloracetat in Methanol einen *apparent pH* von 5.1 und einen *conventional pH* von 7.8 auf (vgl. auch Tabelle 1 in Manuskript 1).

Referenzpuffer für Methanol/Wasser-Mischungen sind in der Literatur nur in einem sehr engen  $\text{pH}^*$ -Bereich aufgeführt. Zur Charakterisierung der CE-Puffer in Methanol/Wasser (1:1, v/v) wurden daher nur die  $\text{pH}_{\text{app}}$ -Werte herangezogen. Für diese Lösungsmittelmischung ist die Abweichung der  $\text{pH}_{\text{app}}$ -von der  $\text{pH}^*$ -Skala deutlich geringer ausgeprägt, sodass die ermittelten  $\text{pK}_{\text{app}}$ -Werte annähernd mit den thermodynamischen Werten übereinstimmen [119]. Ein Vergleich zwischen  $\text{pH}^*$ -Werten der teilwässrigen Referenzpuffer aus der Literatur [120, 121] und den  $\text{pH}_{\text{app}}$ -Werten, die mit der in dieser Untersuchung verwendeten Glaselektrode ermittelt wurden, ergab eine Abweichung von maximal 0.15 pH-Einheiten.

Die Abhängigkeit der effektiven Mobilität der untersuchten Peptide vom pH-Wert des CE-Puffers ist beispielhaft in Abbildung 9 für die Bestimmung der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte in Wasser dargestellt. Die Berechnung der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte erfolgte auf Grundlage der Gleichung 19, wobei zur Berechnung der dritten Dissoziationsstufe ( $\text{pK}_{\text{a}3}$ ) der phenolischen Hydroxylgruppe bei den Tyrosin-enthaltenden Peptiden Met- und Leu- Enkephalin die Einführung eines weiteren Terms  $\mu(\text{Z}^{2-})/(1+10^{\text{pK}_{\text{a}3}-\text{pH}})$  erforderlich war [92]. Die so erhaltenen  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Der Vergleich der ermittelten  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte in Wasser mit Literaturwerten ergab große Übereinstimmungen (vgl. Tabelle 3 in Manuskript 1). Die Bestimmung der  $\text{pK}_{\text{a}3}^*$ -Werte der Enkephalin-Peptide in Methanol war nicht möglich, da die verfügbaren Standardelektrolyte diesen stark alkalischen  $\text{pH}^*$ -Bereich nicht abdecken.



**Abbildung 9.** Effektive Mobilität ( $\mu_{\text{eff}}$ ) der untersuchten Peptide in Abhängigkeit vom pH-Wert in wässriger Lösung. (A)  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe und (B) Met- und Leu-Enkephalin. Die nichtlineare Kurvenanpassung erfolgte entsprechend Gleichung 19. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 1.

Die *actual mobility*, also die Mobilität der vollständig ionisierten Form der Peptide  $\mu(\text{HZ}^+)$  und  $\mu(\text{Z}^-)$ , ist in Methanol/Wasser (1:1, v/v) am geringsten, was mit der hohen Viskosität dieser Lösungsmittelmischung ( $\eta = 1.51$  cP) gegenüber den reinen Lösungsmitteln Wasser ( $\eta = 0.89$  cP) und Methanol ( $\eta = 0.55$  cP) erklärbar ist. Dieser Zusammenhang zwischen der Mobilität eines Ions und der Viskosität des Lösungsmittels wird durch die Walden-Regel beschrieben, die besagt, dass das Produkt aus der absoluten Mobilität (Mobilität in unendlich verdünnter Lösung) eines Ions und der Viskosität des Lösungsmittels konstant ist [100, 122].

**Tabelle 2.** Dissoziationskonstanten der untersuchten Peptide, bestimmt mit Hilfe der CE in Methanol, Methanol/Wasser (1:1, v/v) und Wasser.

	Methanol			Methanol/Wasser (1:1, v/v)			Wasser		
	<i>conventional pH scale</i>			<i>apparent pH scale</i>					
	$\text{pK}_{\text{a1}}^*$	$\text{pK}_{\text{a2}}^*$	$\text{pK}_{\text{a3}}^*$	$\text{pK}_{\text{a1}}$	$\text{pK}_{\text{a2}}$	$\text{pK}_{\text{a3}}$	$\text{pK}_{\text{a1}}$	$\text{pK}_{\text{a2}}$	$\text{pK}_{\text{a3}}$
$\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe	7.68 $\pm 0.04$	10.94 $\pm 0.06$	-	3.67 $\pm 0.04$	7.96 $\pm 0.03$	-	3.00 $\pm 0.03$	7.76 $\pm 0.02$	-
$\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe	7.67 $\pm 0.04$	11.15 $\pm 0.06$	-	3.70 $\pm 0.04$	8.02 $\pm 0.03$	-	3.04 $\pm 0.03$	7.92 $\pm 0.02$	-
$\beta$ -L-Asp-L-PheOMe	6.94 $\pm 0.05$	11.83 $\pm 0.09$	-	2.90 $\pm 0.04$	8.85 $\pm 0.03$	-	2.20 $\pm 0.04$	8.73 $\pm 0.02$	-
$\beta$ -D-Asp-L-PheOMe	6.88 $\pm 0.05$	11.83 $\pm 0.09$	-	2.86 $\pm 0.04$	8.87 $\pm 0.03$	-	2.18 $\pm 0.04$	8.73 $\pm 0.02$	-
Met-Enkephalin	8.19 $\pm 0.13$	9.57 $\pm 0.11$	-	4.03 $\pm 0.10$	7.36 $\pm 0.12$	11.19 $\pm 0.13$	3.33 $\pm 0.06$	7.40 $\pm 0.07$	10.10 $\pm 0.09$
Leu-Enkephalin	8.43 $\pm 0.12$	9.80 $\pm 0.11$	-	4.30 $\pm 0.10$	7.35 $\pm 0.12$	11.20 $\pm 0.13$	3.51 $\pm 0.06$	7.40 $\pm 0.07$	10.10 $\pm 0.09$

### 5.1.2 $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert-Verschiebung in Methanol

Beim Wechsel von Wasser zu Methanol kommt es sowohl für das Dissoziationsgleichgewicht der Carboxylgruppe ( $\text{pK}_{\text{a1}}$ ), als auch für das der protonierten Aminogruppe ( $\text{pK}_{\text{a2}}$ ) zu einem Anstieg der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Werte (Tabelle 2). Das entspricht einer Verringerung der Acidität der entsprechenden Gruppe. Der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert-Vergleich basiert dabei auf den  $\text{pK}_{\text{a}}^*$ -Werten in Methanol, da die Abweichung von den thermodynamischen Werten bei der Verwendung der  $\text{pH}^*$ -Skala am geringsten ist. Der Lösungsmittel-induzierte Effekt der  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert Verschiebung ist für die  $\text{pK}_{\text{a1}}$ -Werte stärker ausgeprägt als für die  $\text{pK}_{\text{a2}}$ -Werte (Tabelle 3), was zu einer „Kompression“ der  $\mu_{\text{eff}} - \text{pH}$  Kurven führt. Barbosa und Mitarbeiter konnten ähnliche Effekte für das Verhalten verschiedener amphiprotischer Chinolon-Derivate wie z.B. Ofloxacin und Ciprofloxacin in Acetonitril/Wasser-Mischungen feststellen [123].

Die theoretische Basis für die Interpretation dieser  $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert-Verschiebungen ( $\Delta\text{pK}_{\text{a}}$ ) ist das *transfer activity coefficient model*, was auf der Änderung der freien Energie ( $\Delta G$ ) beim Transfer eines Teilchens von Wasser in ein organisches Lösungsmittel beruht [119]. Der *transfer activity coefficient*  $\gamma_i$  beim Übergang von Wasser zu Methanol ist für eine Kationensäure ( $\text{HB}^+$ ) geringer als für eine

dissoziierte Neutralsäure ( $A^-$ ), da Kationen in Methanol deutlich besser solvatisiert (und stabilisiert) werden als Anionen. Die in der Literatur aufgeführten Unterschiede zwischen den  $\Delta pK_a$ -Werten für protonierte Basen (maximaler  $\Delta pK_a$ -Wert: 2.7) und Neutralsäuren (maximaler  $\Delta pK_a$ -Wert: 5.0) [124-126] sind damit erklärbar. Wendet man dieses Modell auf die untersuchten Peptide an, so sind die stärkeren  $pK_a$ -Wert Verschiebungen für die Dissoziation der Carbonsäure ( $pK_{a1}$ ) im Vergleich mit denen für die Dissoziation der protonierten Aminogruppe ( $pK_{a2}$ ) erklärbar. Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen  $\Delta pK_a$ -Werte kann anhand der Ladungsbilanz der Dissoziationsreaktionen gegeben werden [123]. Danach kommt es bei der Dissoziation einer Neutralsäure ( $HA \leftrightarrow A^- + H^+$ ) zur Bildung von Ladungen, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen in den Vordergrund treten. Dadurch sinken die Werte der entsprechenden Dissoziationskonstanten (sinkende Acidität) beim Übergang zu einem weniger polaren, organischen Lösungsmittel. Im Gegensatz dazu ändert sich bei der Dissoziation einer Kationensäure ( $HB^+ \leftrightarrow B + H^+$ ) die Anzahl der Ladungen nicht und das Dissoziationsgleichgewicht wird nur durch die Solvatation der einzelnen Spezies beeinflusst.

Die  $pK_a$ -Wert Verschiebungen für die untersuchten Peptide beim Wechsel von Wasser zu Methanol/Wasser (1:1, v/v) ( $\Delta pK_a = 0.10 - 0.79$ ) sind deutlich kleiner als beim Wechsel von Wasser zu reinem Methanol ( $\Delta pK_a = 2.17 - 4.92$ ). Diese Ergebnisse waren aufgrund verschiedener Literaturdaten zu erwarten. Wie für nicht-peptidische Analyte bereits beschrieben [119, 127], führen schon kleinste Mengen Wasser (< 1%) in einem organischen Lösungsmittel zu einer starken Abnahme der  $pK_a$ -Werte. So kommt es bei einer Lösungsmittelzusammensetzung mit mehr als 80% organischem Lösungsmittel zu einer Abnahme des  $pK_a$ -Wertes um 0.2 – 0.4 log-Einheiten pro % Wasser. Bei einem Wassergehalt > 20% kommt es hingegen nur noch zu geringen  $pK_a$ -Wert Verschiebungen (etwa 0.5  $pK_a$ -Einheiten pro 10% Wasser).

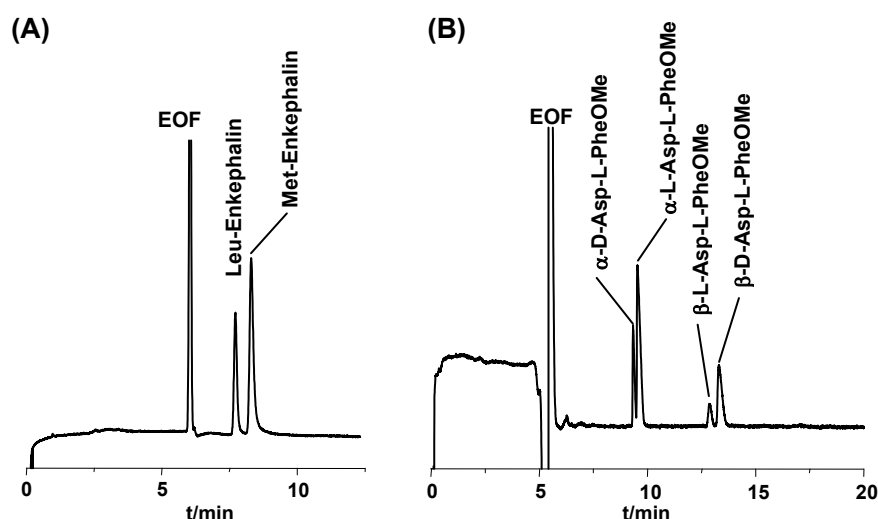
**Tabelle 3.**  $pK_a$ -Wert-Verschiebungen ( $\Delta pK_a$ ) für den Wechsel von Wasser zu Methanol (MeOH-Wasser) und von Wasser zu Methanol/Wasser (1:1, v/v) (MeOH/Wasser-Wasser). Die  $pK_a$ -Werte für Methanol basieren auf der conventional pH scale ( $pK_a^*$ ) [101].

Analyt	$pK_{a1}$		$pK_{a2}$	
	$\Delta pK_{a1}$ MeOH - Wasser	$\Delta pK_{a1}$ MeOH-Wasser - Wasser	$\Delta pK_{a2}$ MeOH - Wasser	$\Delta pK_{a2}$ MeOH-Wasser - Wasser
$\alpha$ -L-Asp-L-PheOMe	4.68	0.67	3.18	0.20
$\alpha$ -D-Asp-L-PheOMe	4.63	0.66	3.23	0.10
$\beta$ -L-Asp-L-PheOMe	4.74	0.70	3.10	0.12
$\beta$ -D-Asp-L-PheOMe	4.70	0.68	3.10	0.14
Met-Enkephalin	4.86	0.70	2.17	-0.04
Leu-Enkephalin	4.92	0.79	2.40	-0.05



### 5.1.3 NACE-Trennung von Enkephalin-Peptiden und Aspartyl-Dipeptiden

Neben der Bestimmung der  $pK_a$ -Werte konnte gezeigt werden, dass nichtwässrige Puffersysteme prinzipiell auch für die CE-Trennung von Peptiden geeignet sind (Abbildung 10). Wie in der wässrigen CE wurde auch in der NACE die höchste Auflösung zwischen den Analyten bei der Verwendung von Puffern mit pH-Werten im Bereich der  $pK_a$ -Werte der Peptide erhalten. Vergleicht man die Werte für die Auflösung zwischen den Peptiden, so kann festgestellt werden, dass die Trennung der Aspartyl-Dipeptide besser in wässrigen Puffern und die Trennung der Enkephalin-Peptide besser in nichtwässrigen Puffern gelingt. So ist im Gegensatz zur wässrigen CE die Trennung von Met- und Leu-Enkephalin als Anionen in der NACE möglich (Abbildung 10A). Die beste Diastereomeren-trennung der isomeren Aspartyl-Dipeptide  $\alpha$ - und  $\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe im nichtwässrigen Milieu gelang unter Verwendung eines Dichloracetat-Puffers mit einem *apparent pH* von 3.8 (Abbildung 10B).



**Abbildung 10.** NACE-Elektropherogramme von (A) Met- und Leu-Enkephalin und (B)  $\alpha/\beta$ -DL-Asp-L-PheOMe. Elektrolytsysteme, (A) 25 mM Natriumacetat-Puffer in Methanol,  $pH_{app} = 7.0$ ; (B) 25 mM Kaliumdichloracetat-Puffer in Methanol,  $pH_{app} = 3.8$ . Für weitere experimentelle Details vgl. Manuskript 1.

## 5.2 Effekte des Lösungsmittels auf die Sekundärstruktur von Polypeptiden

(Manuskript 2)

Einige CE-Studien beschäftigen sich mit dem Effekt der Sekundärstruktur eines Peptides auf sein Migrationsverhalten. Man konnte unter anderem zeigen, dass die elektrophoretische Mobilität von Polypeptiden, die in Form einer  $\alpha$ -Helix vorliegen, deutlich von dem erwarteten Migrationsverhalten abweichen [68]. Der Zusatz nichtwässriger Lösungsmittel zu wässrigen Pufferlösungen begünstigt die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischer Wechselwirkungen und führt damit zu einer Stabilisierung geordneter Sekundärstrukturen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Melittin, eine Hauptkomponente des Bienengiftes, in Wasser überwiegend als Zufallsknäuel vorliegt und nach Zusatz verschiedener Alkohole (Methanol, Ethanol, Isopropanol u.a.) eine  $\alpha$ -helikale Konformation ausbildet [128]. Castagnola und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von 2,2,2-Trifluorethanol, einem so genannte *helix-inducing solvent*, auf die CE-Trennung kleiner polarer Peptide [129]. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Stabilisierung von geordneten Sekundärstrukturen nur geringe Effekte auf die Trennung kleiner polarer Peptide hat, jedoch für die Trennung großer apolarer Peptide bedeutsam sein könnte. Diese Aussage war die Hauptmotivation für die Durchführung der vorliegenden Studie.

**Tabelle 4.** Aminosäuresequenzen und Molekularmassen ( $M_r$ ) der untersuchten  $\alpha$ -helikalen Polypeptide. Aib –  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, Pheol – Phenylalaninol, Leuol – Leucinol.

Peptid	Aminosäuresequenz	$M_r$
ALM F30 <sup>a)</sup>	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib <sup>5</sup> -Ala-Gln-Aib-Val-Aib <sup>10</sup> -Gly-Leu-Aib-Pro-Val <sup>15</sup> -Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol <sup>20</sup>	1964.3
[des-Leuol] AmpA	Ac-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu <sup>5</sup> -Aib-Gln-Aib-Aib-Aib <sup>10</sup> -Gln-Leu-Aib-Gln-OH	1540.7
[des-Ac] AmpA	H-Trp-Ala-Aib-Aib-Leu <sup>5</sup> -Aib-Gln-Aib-Aib-Aib <sup>10</sup> -Gln-Leu-Aib-Gln-Leuol <sup>15</sup>	1580.5
[des-AcTrp <sup>1</sup> ] AmpA	H-Ala-Aib-Aib-Leu-Aib <sup>5</sup> -Gln-Aib-Aib-Aib-Gln <sup>10</sup> -Leu-Aib-Gln-Leuol	1395.9
Melittin	H-Gly-Ile-Gly-Ala-Val <sup>5</sup> -Leu-Lys-Val-Leu-Thr <sup>10</sup> -Thr-Gly-Leu-Pro-Ala <sup>15</sup> -Leu-Ile-Ser-Trp-Ile <sup>20</sup> -Lys-Arg-Lys-Arg-Gln <sup>25</sup> -Gln-NH <sub>2</sub>	2846.5
Cecropin P1	H-Ser-Trp-Leu-Ser-Lys <sup>5</sup> -Thr-Ala-Lys-Lys-Leu <sup>10</sup> -Glu-Asn-Ser-Ala-Lys <sup>15</sup> -Lys-Arg-Ile-Ser-Glu <sup>20</sup> -Gly-Ile-Ala-Ile-Ala <sup>25</sup> -Ile-Glu-Gly-Gly-Pro <sup>30</sup> -Arg-OH	3338.9
Magainin2	H-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe <sup>5</sup> -Leu-His-Ser-Ala-Lys <sup>10</sup> -Lys-Phe-Gly-Lys-Ala <sup>15</sup> -Phe-Val-Gly-Glu-Ile <sup>20</sup> -Met-Asn-Ser-OH	2846.5

<sup>a)</sup> Gemisch verschiedener  $\alpha$ -helikaler Polypeptide (vgl. Abschnitt 5.3). Sequenz der Hauptkomponente ist aufgeführt.

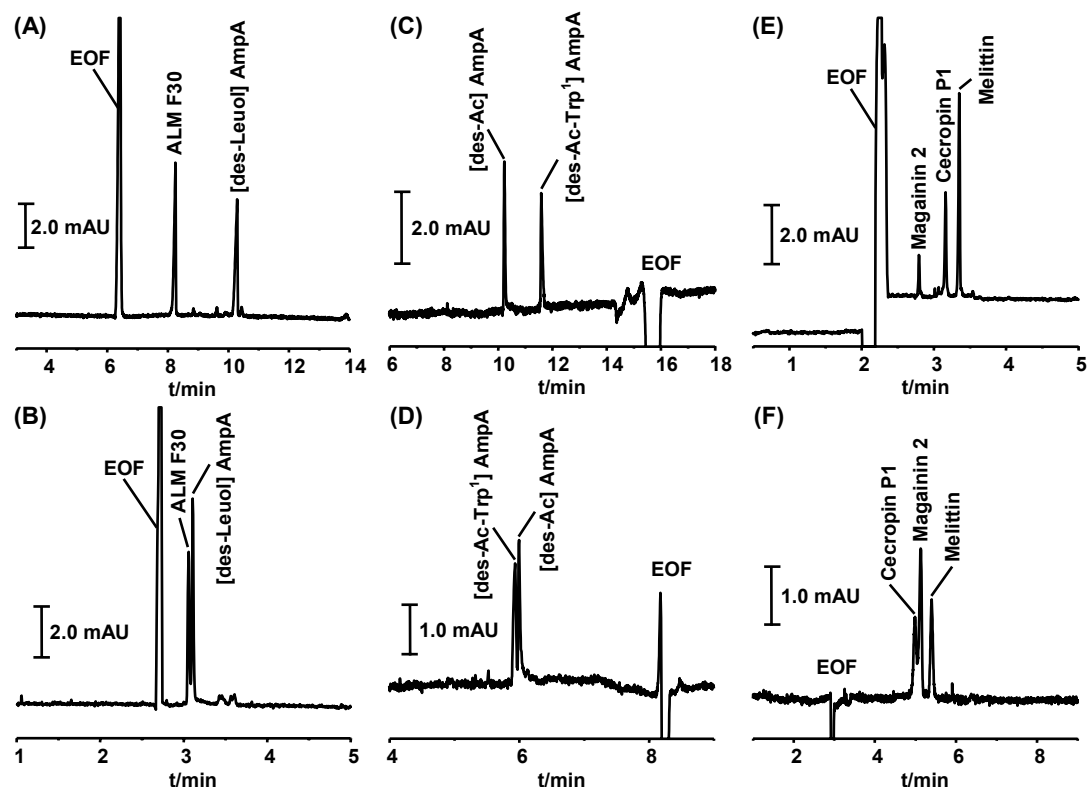
Um den Effekt der Sekundärstruktur von Peptiden auf das Migrationsverhalten zu zeigen, wurde die Trennung verschiedener  $\alpha$ -helikaler Polypeptide (Tabelle 4) in wässrigen und nichtwässrigen Puffersystemen untersucht. Das mikroheterogene Alamethicin F30 und die Ampulosporin A-Derivate gehören zur Klasse der Peptaibole. Diese aus Pilzkulturen gewonnen Sekundärmetaboliten sind lineare Peptide, welche die nicht proteinogene Aminosäure  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib) enthalten und durch einen zum Alkohol reduzierten C-Terminus und einen acetylierten N-Terminus charakterisiert

sind [130]. Die Ausbildung helikaler Sekundärstrukturen und der amphipatische Charakter der Peptaibole bedingen ihre membranmodifizierenden Eigenschaften [131]. Stark basische Peptidantibiotika, wie Magainin 2, Melittin, und Cecropin P1, gehören zur zweiten Gruppe von Analyten, die in dieser Studie untersucht wurden. Auch diese Peptide haben einen amphipatischen Charakter, neigen zur Bildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen und zeigen membranmodifizierende Eigenschaften [132, 133]. Um Effekte der Sekundärstruktur auf die Selektivität von anderen Lösungsmittel-induzierten Effekten abzugrenzen, wurden neben diesen Polypeptiden verschiedene kleine Peptide (2-5 Aminosäuren), die keine definierten Sekundärstrukturen ausbilden können, in die Untersuchung mit einbezogen.

Der Anteil der verschiedenen Strukturelemente wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -turn und Zufallsknäuel wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie bestimmt. Im Vergleich zur NMR-, Raman- und FT-IR-Spektroskopie, die ebenfalls eine Konformationsanalyse in Lösung gestatten, kann die CD-Spektroskopie relativ einfach durchgeführt und ausgewertet werden [134]. Außerdem werden im Vergleich zu den anderen Techniken deutlich geringere Analytkonzentrationen benötigt. Grundlage der CD-Spektroskopie ist die ungleiche Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht durch die optisch anisotropen Sekundärstrukturen der Polypeptide. Die Interpretation von CD-Spektren beruht meist auf einem Vergleich mit Spektren von Proteinen, deren Sekundärstruktur bekannt ist.

### 5.2.1 Selektivität der CE-Trennung $\alpha$ -helikaler Polypeptide in wässrigen und nichtwässrigen Puffern

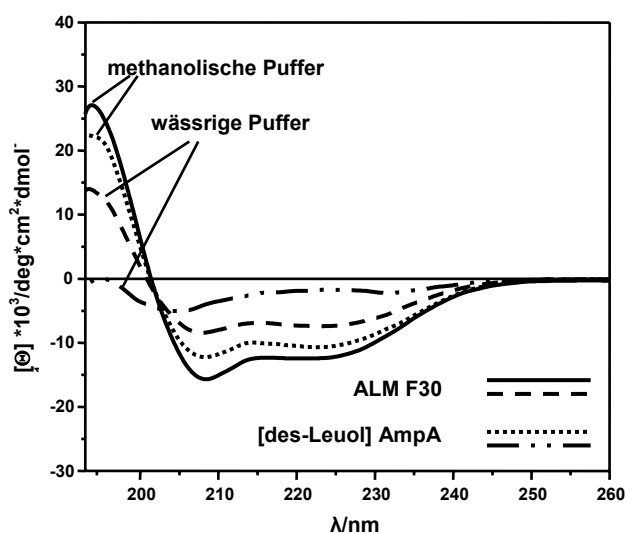
Die NACE-Trennungen wurden nur in Methanol und Methanol/Acetonitril-Mischungen durchgeführt. Das *helix-inducing solvent* 2,2,2-Trifluorethanol wurde aufgrund des für die CE sehr ungünstigen  $\varepsilon/\eta$ -Quotienten von  $15 \text{ cP}^{-1}$  nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Optimierung der Trennung erfolgte in allen Fällen ausschließlich durch eine Variation des pH-Wertes. Abbildung 11 zeigt die Elektropherogramme der Polypeptide unter pH-optimierten Bedingungen in wässrigen und nichtwässrigen Puffern. Durch die Verwendung nichtwässriger Puffersysteme kann die Trennung dieser Peptide deutlich verbessert werden. Darüberhinaus war die Trennung der Minorkomponenten des mikroheterogenen Alamethicin F30 in methanolischen Puffersystemen deutlich besser möglich als in wässrigen CE-Trennsystemen (vgl. Abschnitt 5.3.2). Neben diesen Selektivitätsvorteilen der NACE wurde eine Umkehr der Migrationsreihenfolge für die Paare Magainin 2/Cecropin P1 und [des-Ac] AmpA/[des-AcTrp<sup>1</sup>] AmpA in den verschiedenen Medien beobachtet. Die Trennung der stark basischen Peptidantibiotika Melittin, Cecropin P1 und Magainin 2 gelang nur in dynamisch beschichteten Kapillaren. Sowohl in wässrigen als auch in nichtwässrigen Puffern kam es in unbehandelten Quarzkapillaren zu einem starken *peak tailing* aufgrund der Adsorption dieser drei stark basischen Peptide an die Kapillarwand. Durch die dynamische Beschichtung der Kapillarwand mit dem Polykation Hexadimethrinbromid (Polybrene<sup>®</sup>) konnte die Wandadsorption der Analyten effektiv verhindert werden. Die Trennung der protonierten Peptide erfolgte bei der Verwendung dieser Beschichtung nach dem EOF, da durch die Positivierung der Kapillarwand ein zur Anode gerichteter EOF erzeugt wurde (Abbildung 11 E/F).



**Abbildung 11.** Elektropherogramme der  $\alpha$ -helikalen Polypeptide unter Verwendung pH-optimierter nichtwässriger (A, C, E) und wässriger Elektrolytsysteme (B, D, F). Für weitere experimentelle Details vgl. Manuskript 2.

Abbildung 12 zeigt beispielhaft die CD-Spektren von ALM F30 und [des-Leuol] ALM F30 in wässrigem und nichtwässrigem CE-Puffer. Die CD-Spektren im nichtwässrigen Milieu zeigen deutlich intensivere Banden bei 190 nm (Maximum), 206 nm (Minimum) und 222 nm (Minimum), was auf einen hohen Anteil helikaler Strukturelemente hindeutet.

Aufgrund des relativ hohen Gehaltes an Essigsäure (0.5-1.0 M) in den CE-Puffern, die für die Trennung von [des-Ac] AmpA und [des-Ac-Trp<sup>1</sup>] AmpA genutzt wurden, und der damit verbundenen hohen Hintergrundabsorption unter 210 nm wurden die CD-Spektren dieser zwei Polypeptide in reinem Lösungsmittel aufgenommen, während alle anderen CD-Spektren in den jeweiligen CE-Puffern gemessen wurden. Die Interpretation der CD-Spektren erfolgte mit Hilfe der CDPro-Software auf Grundlage der CD-Daten von 56 Proteinen. Für alle untersuchten Polypeptide wurde ein Anstieg des



**Abbildung 12.** CD-Spektren von ALM F30 und [des-Leuol] AmpA in wässrigen und methanolischen CE-Elektrolytsystemen. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 2.

$\alpha$ -helikalen Anteils bei Wechsel vom wässrigen zum nichtwässrigen System beobachtet. Im wässrigen Milieu liegen zu etwa gleichen Teilen  $\beta$ -Faltblatt-,  $\beta$ -turn- und *random coil*-Strukturelemente vor, während  $\alpha$ -helikale Anteile in den Hintergrund treten (vgl. Tabelle 4 in Manuskript 2).

**Tabelle 5.** Trennselektivitäten ( $r$ ) für die Bestimmung der  $\alpha$ -helikalen Polypeptide im Vergleich zu kleinen Oligopeptiden mit Hilfe der NACE und der wässrigen CE. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 2. Die Berechnung der Selektivitätskoeffizienten erfolgte nach  $r = \mu_1/\mu_2$ ,  $\mu_1 > \mu_2$ , wobei  $\mu_1$  und  $\mu_2$  die effektiven Mobilitäten der Analyten darstellen.

	$r_{\text{NACE}}^{\text{a)}}$	$r_{\text{ACE}}^{\text{b)}}$	$r_{\text{NACE}} / r_{\text{ACE}}$
<i><math>\alpha</math>-helikale Polypeptide (14-31 Aminosäuren)</i>			
[des-Leuol] AmpA / ALM F30	1.69	1.12	1.51
[des-Ac] AmpA / [des-Ac-Trp <sup>1</sup> ] AmpA	1.50	0.96	1.56
Cecropin P1 / Magainin 2	1.50	0.96	1.56
Melittin / Magainin 2	1.71	1.11	1.54
Melittin / Cecropin P1	1.14	1.11	1.03
<i>kleine Oligopeptide (2-5 Aminosäuren)</i>			
Ala-Phe LL / LD	1.29	1.19	1.08
$\alpha$ -Asp-PheOMe / $\beta$ -Asp-PheOMe	3.25	3.56	0.91
Ala-Phe-Gly / Gly-Ala-Phe	1.17	1.17	1.00
Gly-Gly-Tyr / Tyr-Gly-Gly	1.28	0.93	1.38
Gly-Ala-Phe / Gly-Gly-Tyr	1.11	1.04	1.07
Tyr-Gly-Gly / Gly-Leu-Tyr	1.07	1.13	0.95
Leu-Enkephalin / [D-Ala <sup>2</sup> ]-Leu-Enkephalin	1.14	1.07	1.07
Met-Enkephalin / Leu-Enkephalin	1.40	1.13	1.24

a) Selektivitätskoeffizient NACE

b) Selektivitätskoeffizient wässrige CE (aqueous CE, ACE)

Eine Übersicht über die Trennselektivitäten, die unter optimierten pH-Bedingungen in wässrigen und nichtwässrigen CE-Puffern erhalten wurden, gibt Tabelle 5. Der Effekt des Lösungsmittels auf die Selektivität der CE-Trennung ist bei den  $\alpha$ -helikalen Polypeptiden stärker ausgeprägt als bei den kleineren Oligopeptiden. Die deutliche Verbesserung der Trennung  $\alpha$ -helikaler Polypeptide im nichtwässrigen Milieu kann hauptsächlich mit Unterschieden in den Stokeschen Radien erklärt werden, die entscheidend durch die Sekundärstruktur bestimmt werden. Die große Bedeutung hydrodynamischer Reibungskräfte für die Abbremsung der Ionenbewegung im nichtwässrigen Milieu wurde bereits von Kenndler und Mitarbeitern für große organische Ionen mit geringer Ladungsdichte gezeigt [135]. Lösungsmittel-induzierte Selektivitätsveränderungen für diese Analyten können danach zu einem großen Teil auf Unterschiede in den Stokeschen Radien zurückgeführt werden. Neben Veränderungen der Raumstruktur kann die Trennselektivität auch durch unterschiedlich stark ausgeprägte  $pK_a$ -Wert-Verschiebungen beim Wechsel von wässrigen zu nichtwässrigen Puffern verbessert werden (vgl. Abschnitt 5.1). Die Umkehr der Migrationsreihenfolge der Tripeptide Gly-Gly-

Tyr und Tyr-Gly-Gly in der NACE im Vergleich mit der wässrigen CE ist beispielsweise durch  $pK_a$ -Wert-Verschiebungen erklärbar. Allerdings sollten diese  $pK_a$ -Wert-Verschiebungen sowohl bei den Oligopeptiden als auch bei den Polypeptiden in etwa gleichem Ausmaß auftreten. Neben den Effekten organischer Lösungsmittel auf den Stokeschen Radius und den  $pK_a$ -Wert sind weitere Phänomene beschrieben, die eine Selektivitätssteigerung in der NACE verursachen können, wie z. B. die Heterokonjugatbildung in Acetonitril [136] und die gesteigerte Tendenz zur Ionenpaarbildung [95]. Zusätzlich zu den Veränderungen der Sekundärstruktur der Polypeptide können diese Phänomene zu einem Anstieg der Trennselektivität beitragen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die NACE eine interessante Alternative für die Analyse von Polypeptiden mit Lösungsmittel-abhängiger Sekundärstruktur darstellt.

### 5.3 Charakterisierung des mikroheterogenen Peptiabol-Antibiotikums Alamethicin F30 mittels NACE-ESI-MS

(Manuskripte 3 und 4)

#### 5.3.1 Peptaibole – Vorkommen, biologische Aktivität und Analytik

Peptaibole sind aus Pilzkulturen gewonnene Sekundärmetaboliten, die von verschiedenen imperfekten Pilzen produziert werden. Meist handelt es sich um auf Pflanzen oder Pilzen parasitierende Arten der Gattungen *Trichoderma*, *Emericellopsis* und *Acremonium* [137]. Wie bereits in Abschnitt 5.2 ausgeführt wurde, zeichnen sich Peptiabol-Peptide durch folgende Merkmale aus [130]:

- es handelt sich um lineare Peptide, bestehend aus 5-20 Aminosäuren,
- sie enthalten die nichtproteinogene Aminosäure  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Aib),
- der C-terminus ist zum Alkohol reduziert,
- der N-Terminus ist acetyliert und
- sie zeigen amphiphile Eigenschaften.

Die Biosynthese der Peptaibole ist nicht ribosomal gesteuert, sondern wird von einem unspezifischen Multienzymkomplex durchgeführt. Die Aminosäuren werden in Form von Thioestern am synthetisierenden Enzym aktiviert und dann in die Peptidkette eingebaut [138, 139]. Aus dem unspezifischen Einbau der Aminosäuren resultiert die Mikroheterogenität der Peptide [140, 141] wobei in den meisten Fällen ein oder zwei Sequenzanaloge dominieren.

Peptaibole besitzen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten. So zeigen alle Vertreter dieser Klasse sowohl bakterizide als auch fungizide Eigenschaften. Bei einer Reihe von Peptaibolen wurde festgestellt, dass sie die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien entkoppeln [142]. Weiterhin wurden für einige Vertreter dieser Stoffgruppe *in vitro* Zytotoxizität gegen humane Krebszelllinien [143] und neuroleptische Aktivitäten [144, 145] nachgewiesen. Die meisten dieser Eigenschaften sind auf die Membranaktivität der Peptide zurückzuführen. Peptaibole sind in der Lage, sich sowohl spannungsabhängig als auch -unabhängig in Lipiddoppelmembranen zu integrieren. Durch kooperierende oligomere Aggregate mehrerer amphiphiler helikaler Peptiabolmoleküle bilden sich transmembranäre Ionenkanäle aus [146, 147].

Die strukturelle Charakterisierung der Peptaibole erfolgt heutzutage überwiegend mit Hilfe von ESI-MS- und MALDI-MS-Verfahren, wobei Tandem-MS und MS<sup>n</sup>-Techniken für die Sequenzierung eine besonders große Rolle spielen [148]. Da Peptaibole häufig in Form mikroheterogener Mischungen vorliegen, ist die Kopplung des Massenspektrometers mit der HPLC über ein ESI-Interface besonders hilfreich. So konnten in den letzten Jahren u.a. die Stilboflavine [149], Trichotoxine [150], Antiamoebine [151] und Alamethicine [152] mittels HPLC-ESI-MS sequenziert werden.

Alamethicine sind Peptiabol-Peptide, die aus 20 Aminosäuren aufgebaut sind (20-AS-Peptaibole) und aus dem Kulturfiltrat des Schimmelpilzes *Trichoderma viride* isoliert werden können. Nach der ersten Isolierung von Alamethicin durch Meyer und Reusser im Jahr 1967 [153] wurde eine zyklische Struktur vorgeschlagen, da weder der C- noch N-Terminus in freier Form nachgewiesen werden konnte [154]. Basierend auf <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchungen und der Analyse acidolytisch erzeugter

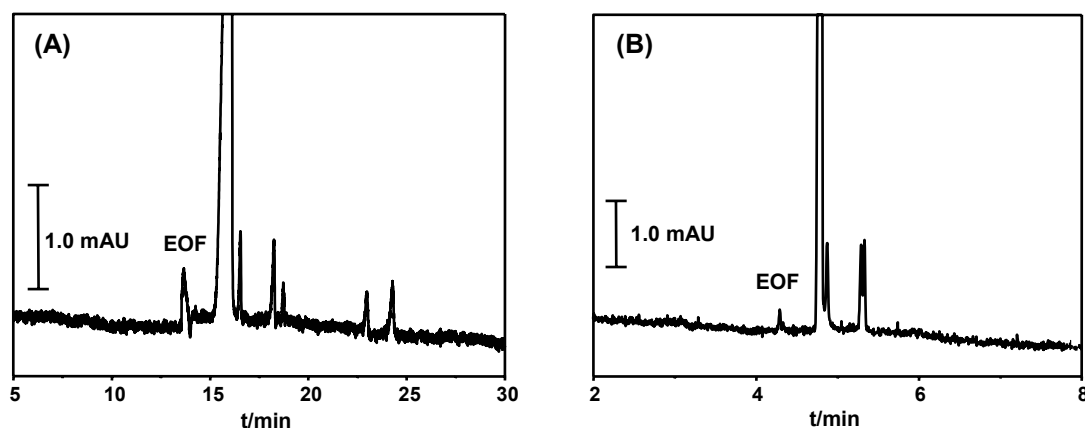
Peptidfragmente wurde 1975 jedoch von verschiedenen Autoren eine lineare Struktur vorgeschlagen, die sowohl den Aminoalkohol Phenylalaninol (Pheol) als auch N-acetyliertes Aib enthält [155, 156]. Die erste vollständige Sequenzierung der Hauptkomponenten des Alamethicins erfolgte 1977 mittels Elektronenstoßionisations (EI-MS)- und Felddesorptionsionisations (FD-MS)-Massenspektrometrie [157]. Die so ermittelte Primärstruktur konnte 1985 durch Totalsynthese bestätigt werden [158]. Die dünnenschichtchromatographische Untersuchung an Kieselgel H des Rohextraktes von *T. viride* zeigte, dass Alamethicin aus zwei Hauptgruppen von Peptaibol-Peptiden besteht: dem sauren Alamethicin F30 (ALM F30) und dem neutralen Alamethicin F50 (ALM F50), die auf Grundlage ihres  $R_f$ -Wertes bezeichnet wurden. Die Hauptkomponenten von ALM F30 und ALM F50 unterscheiden sich in der Aminosäure in Position 18, welche im Fall von ALM F30 die saure Glutaminsäure (Glu) und im Fall von ALM F50 das neutrale Glutamin (Gln) ist [152, 157]. In einer HPLC-ESI-MS Studie aus dem Jahr 2003 [152] konnte eine Vielzahl von Nebenkomponenten des ALM F50 und des ALM F30 identifiziert werden. ALM F30 besteht danach aus zwei Hauptkomponenten, die sich durch einen Austausch der Aminosäure in Position 6 (Ala oder Aib) auszeichnen.

Die Vorteile nichtwässriger CE-Trennsysteme für die Trennung  $\alpha$ -helikaler Peptide wurden bereits in Abschnitt 5.2 gezeigt. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, diese Vorteile mit den Möglichkeiten der ESI-MS-Detektion zur strukturellen Charakterisierung der Einzelkomponenten des mikroheterogenen ALM F30 zu verbinden.

### 5.3.2 NACE-Trennung der Alamethicin F30-Peptide

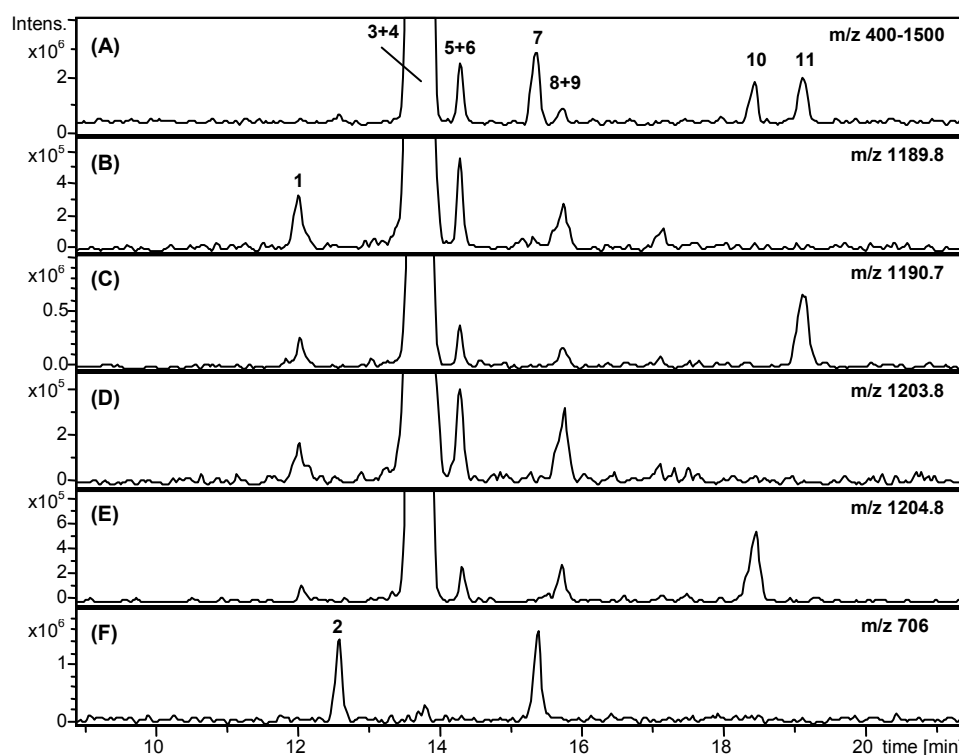
Vor der Durchführung der CE-ESI-MS-Experimente erfolgte eine Optimierung der NACE-Trennung der sauren ALM F30-Peptaibole unter Verwendung verschiedener alkalischer Puffersysteme mittels NACE-UV. Bei der Auswahl der Lösungsmittel wurde auch in diesem Fall ausschließlich auf Methanol, Acetonitril und Mischungen dieser beiden Lösungsmittel zurückgegriffen, da diese einerseits ein günstiges  $\epsilon/\eta$ -Verhältnis aufweisen, damit eine ausreichend hohe elektrophoretische und elektroosmotische Mobilität gewährleisten, und andererseits ihre geringe Oberflächenspannung und die leichte Verdampfbarkeit den ESI-Prozess günstig beeinflussen (vgl. Abschnitt 2.5.5). Die besten Trennergebnisse lieferte das folgende sehr einfache Elektrolytsystem: 12.5 mM Ammoniumformiat in Methanol,  $\text{pH}^* = 7.4$ . Die Verwendung von reinem Acetonitril und Acetonitril/Methanol-Mischungen mit einem hohen Acetonitril-Anteil ergab sehr geringe Mobilitäten der deprotonierten sauren Peptaibole, wodurch eine Trennung in diesen Lösungsmitteln nicht möglich war. Dieses Verhalten kann mit der Bildung von Homo- oder Heterokonjugaten der Analyt-Ionen erklärt werden. Dieses Phänomen tritt sehr häufig in dipolar aprotischen Lösungsmitteln auf und verursacht eine Verringerung der Mobilität dissoziierter Brønsted-Säuren [127, 159]. Die Trennung in wässriger Lösung wurde in 25 mM Boratpuffer im pH-Bereich 8-12 untersucht, wobei die beste Trennung bei pH 11 erhalten wurde. Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der Elektropherogramme des untersuchten ALM F30, die mit diesem wässrigen Puffersystem und mit dem optimierten nichtwässrigen Puffersystem erhalten wurden. Das NACE-System ermöglicht die Basislinientrennung von sechs Peaks, während das wässrige System lediglich vier schlecht getrennte Peaks zeigt.





**Abbildung 13.** CE-UV-Elektropherogramme des mikroheterogenen ALM F30 unter Verwendung eines nichtwässrigen (A) bzw. wässrigen Elektrolytsystems (B). Für experimentelle Details vgl. Manuskript 4.

Die Migrationsreihenfolge aller Einzelkomponenten des ALM F30 wurde durch NACE-ESI-MS-Messungen bestimmt (vgl. Abschnitt 5.3.3). Abbildung 14 zeigt das Basispeakelektropherogramm ( $m/z$  400-1500) und die Massenspuren ausgewählter charakteristischer Fragmente. Im Vergleich zu den NACE-UV-Messungen konnten zwei weitere Peaks detektiert werden. Außerdem erlaubt die MS-Detektion die Bestimmung weiterer comigrierender Peptide, sodass insgesamt 11 ALM F30-Komponenten identifiziert werden konnten. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die in dieser Studie identifizierten ALM F30-Komponenten. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse von Brückner und Mitarbeitern, die das mikroheterogene ALM F30 mittels HPLC-MS untersuchten [152]. Es konnten insgesamt



**Abbildung 14.** Basispeakelektropherogramm (A) und charakteristische Massenspuren (B-F) für die NACE-ESI-IT-MS-Messungen des ALM F30 im full-scan Modus. (B-E) Massenspuren der verschiedenen  $b_{13}$ -Fragmente. (F)  $[M+2H]^{2+}$  der Pyroglutamyl-Peptaibole. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 3. Die Nummerierung der ALM F30-Komponenten erfolgte entsprechend Tabelle 6.

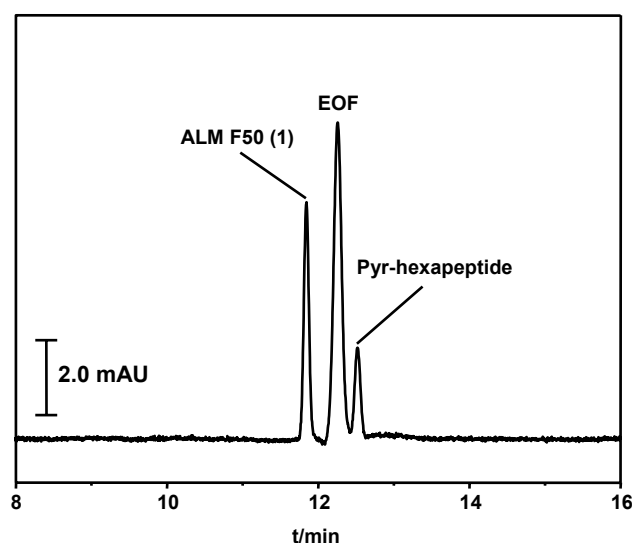


sieben neue ALM F30-Sequenzen mit Hilfe der NACE-MS identifiziert werden, wobei die Pyroglutamyl-Peptaibole **2** und **7** bzw. die desPheol-Peptaibole **8** und **9** besonders hervorzuheben sind, da bisher nur Alamethicine nachgewiesen wurden, die aus 20 Aminosäuren (AS) bestehen. Die Mehrheit der mittels NACE-MS identifizierten ALM F30-Komponenten besitzt eine zweite Carboxylfunktion, verursacht durch einen Gln/Glu-Austausch oder durch den Verlust des C-terminalen Aminoalkohols. Mit Ausnahme von [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) wurden diese Verbindungen in der HPLC-Studie nicht nachgewiesen [152]. Hingegen wurden ALM F30-Komponenten, die durch einen Austausch neutraler Aminosäuren wie Aib/Val in Position 9, Leu/Val in Position 12 oder Aib/Val in Position 17 gekennzeichnet sind (Tabelle 7), im Gegensatz zur NACE-MS mittels HPLC-MS identifiziert. Offenbar werden ALM F30-Peptaibole mit einer Carboxylfunktion besser durch HPLC getrennt, während die Komponenten mit zwei Carboxylfunktionen besser mittels NACE analysiert werden. Diese Ergebnisse belegen die Komplementarität beider Verfahren, was auf die grundsätzlich verschiedenen Trennmechanismen zurückgeführt werden kann.

Mit Ausnahme der neutralen Peptaibole ALM F50 (**1**) und [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**) besitzen alle anderen ALM F30-Komponenten ein Glu-Rest in Position 18. Dadurch sind diese Peptide unter den vorliegenden CE-Bedingungen negativ geladen und zeigen anodische Mobilität.

Die schwach anodische bzw. kathodische Mobilität der neutralen Peptide ALM F50 (**1**) und [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**) zeigt die Besonderheiten nichtwässriger Elektrolytsysteme in der CE, denn dieses Migrationsverhalten kann nicht aus der Peptidsequenz abgeleitet werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden eine kommerzielle Probe des ALM F50 und ein synthetisches Pyroglutamyl-Modellpeptid (Pyr-Hexapeptid, Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol) im NACE-System untersucht (Abbildung 15). Sowohl die anodische Mobilität des Pyr-Hexapeptides ( $-0.27 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) als auch die kathodische Mobilität des ALM F50 ( $0.45 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) gegenüber Toluol als EOF-Marker konnte im NACE-Elektrolytsystem bestätigt werden. Im wässrigen Borat-Puffer hingegen zeigen beide Peptide keine Eigenmobilität und comigrieren mit dem EOF. Dieses ungewöhnliche Migrationsverhalten neutraler Analyten im methanolischen Elektrolytsystem kann durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und den Puffer-Ionen erklärt werden, die in Lösungsmitteln mit niedriger Dielektrizitätszahl prinzipiell stärker ausgeprägt sind (vgl. Abschnitt 2.5.1).

Die Migrationsreihenfolge der negativ geladenen 19- und 20-AS-Peptaibole ist gekennzeichnet durch ein paarweises Auftreten von Peptiden, die mit Ausnahme eines Ala/Aib-Austausches in Position 6 identische Sequenzen aufweisen. Im Vergleich zum Paar der Hauptkomponenten ALM F30 (**4**) und [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**) sind die



**Abbildung 15.** NACE-Elektropherogramm von ALM F50 (**1**) und Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Pyr-Hexapeptid). Experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 13.

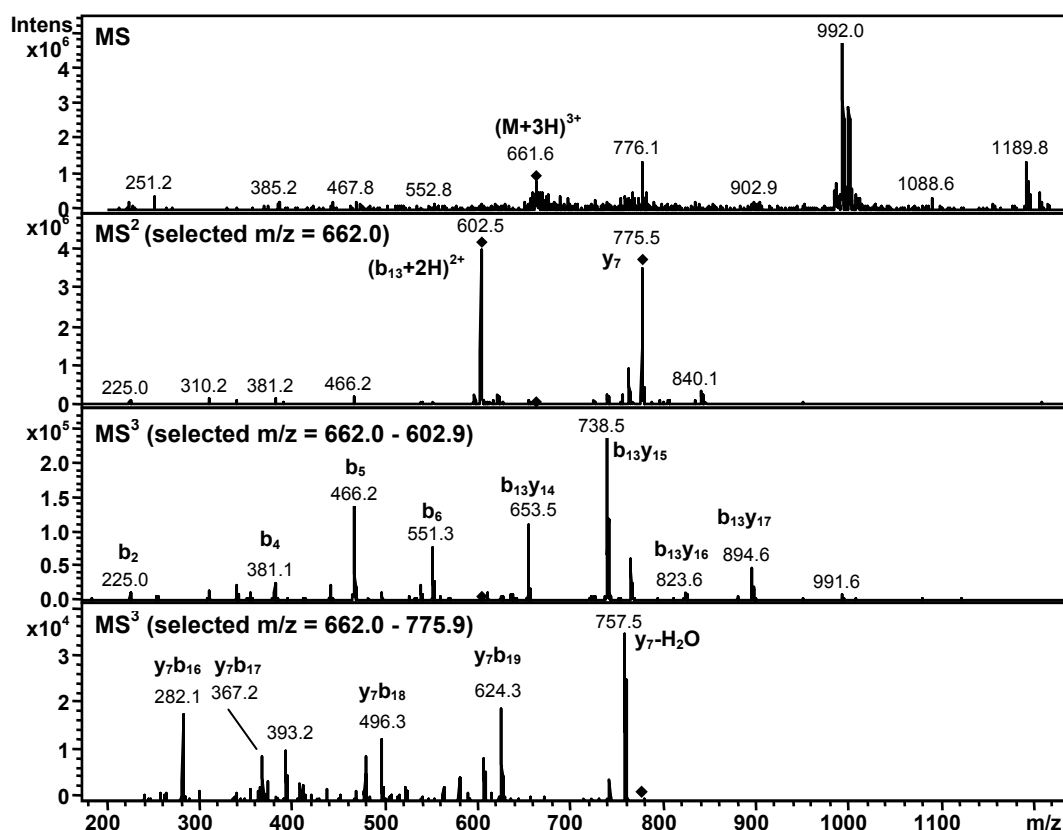
anderen Paare durch eine zusätzliche Carboxylgruppe gekennzeichnet, die durch den Austausch von Gln gegen Glu in Position 19, i.e. [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**5**) und [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (**6**), durch einen Austausch von Gln gegen Glu in Position 7, i.e. [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) und [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**10**) oder durch den Verlust des C-terminalen Aminoalkohols Pheol, i.e. [desPheol] ALM F30 (**8**) und [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (**9**), gebildet wird. Mit Ausnahme von [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**11**) und [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (**10**) können die entsprechenden Ala<sup>6</sup>- und Aib<sup>6</sup>-Peptidisomeren mit Hilfe der NACE nicht getrennt werden.

Die Position der zweiten negativen Ladung im Vergleich zur Carboxylfunktion an Glu<sup>18</sup> hat einen entscheidenden Einfluss auf das Migrationsverhalten der Peptide. Sind wie bei den Glu<sup>19</sup>-ALM F30-Komponenten **5** und **6** und den desPheol-ALM F30-Komponenten **8** und **9** die beiden negativen Ladungen eng benachbart, kommt es zur Comigration der entsprechenden Ala<sup>6</sup>- und Aib<sup>6</sup>-Peptide. Hingegen ist eine Basislinientrennung der Glu<sup>7</sup>-Peptide **10** und **11** möglich, da bei diesen Peptiden die negativen Ladungen weit voneinander entfernt sind. Darüberhinaus beobachtet man eine deutlich höhere anodische Mobilität der Glu<sup>7</sup>-Peptide gegenüber den massegleichen Glu<sup>19</sup>-Isomeren. Diese Beobachtungen sind mit dem von Cross und Mitarbeitern beschriebenen ladungsinduzierten volumetrischen Effekt erklärbar [69, 70]. Danach kommt es bei Peptiden mit eng benachbarten Ladungen zu einer Aufweitung der Struktur, was zu einem erhöhten Reibungswiderstand und damit zu einer verringerten Mobilität führt (vgl. Abschnitt 2.3).

### 5.3.3 Sequenzierung der ALM F30-Komponenten mittels NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup>

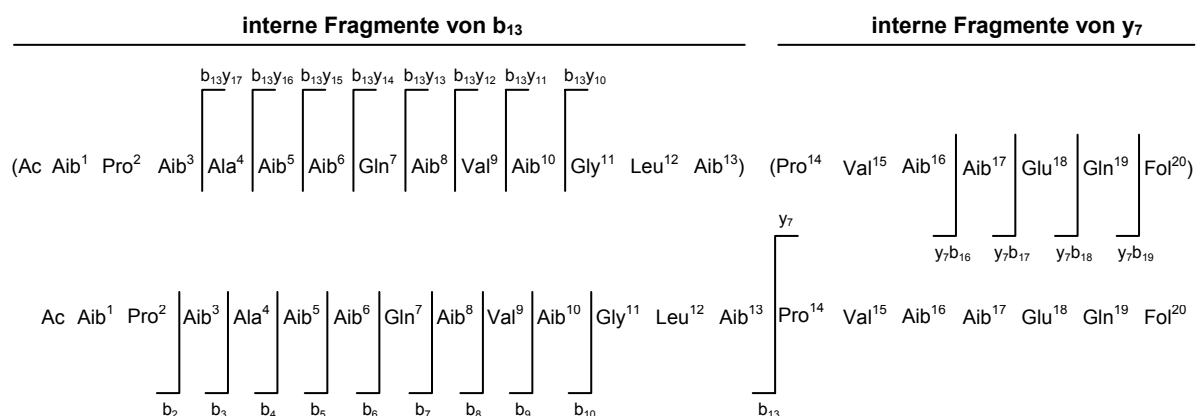
Die Bestimmung der AS-Sequenz der ALM F30-Peptaibole wurde mittels NACE-ESI-IT-MS<sup>n</sup> (n = 2-3) im positiven Ionisierungsmodus durchgeführt. Precursor-Ionen für die MS<sup>2</sup>-Spektren waren die zwei- oder dreifach geladenen Pseudomolekül-Ionen [M+2H]<sup>2+</sup> und [M+3H]<sup>3+</sup>. Die daraus gebildeten Fragment-Ionen [b<sub>13</sub>+2H]<sup>2+</sup> und y<sub>7</sub> wurden als Precursor-Ionen für die MS<sup>3</sup>-Analyse selektiert. Abbildung 16 zeigt beispielhaft die ESI-IT-MS<sup>n</sup>-Spektren von [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**). Die bevorzugte Bildung der b<sub>13</sub>- und y<sub>7</sub>-Fragmente, die auch im *full-scan* Modus (ohne stoßinduzierten Zerfall in der Ionenfalle) des IT-MS-Gerätes beobachtet wurden, ist auf die äußerst labile Aib-Pro-Bindung zurückzuführen. Dieses charakteristische Fragmentierungsverhalten wurde auch bei anderen Peptaibolen wie den Harzianinen [141], Stilboflavinen [149], Trichotoxinen [150] und Trichofuminen [160], beobachtet und kann mit der sterischen Instabilität der Prolin-Bindung erklärt werden [161]. Die MS<sup>3</sup>-Analyse des [b<sub>13</sub>+2H]<sup>2+</sup>-Fragment-Ions bildet die b<sub>2</sub>-b<sub>10</sub>-Acylium-Ionen-Serie und die einfach protonierten internen Fragmente b<sub>13</sub>y<sub>10</sub>-b<sub>13</sub>y<sub>17</sub>. Die C-terminale Sequenz wurde anhand der MS<sup>3</sup>-Analyse des y<sub>7</sub>-Fragmentes und der dabei gebildeten internen Fragment-Ionen-Serie (y<sub>7</sub>b<sub>19</sub>-y<sub>7</sub>b<sub>16</sub>) ermittelt. Ein Fragmentierungsschema zu den ESI-IT-MS<sup>n</sup>-Spektren des [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**) ist in Abbildung 17 dargestellt.

Die Sequenzen der beiden Pyroglutamyl-Peptide (14-AS-Peptaibole) [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F50 (**2**) und [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (**7**) wurden anhand der MS<sup>3</sup>-Analyse der b<sub>7</sub>- und y<sub>7</sub>-Fragment-Ionen bestimmt. Die MS<sup>3</sup>-Spektren dieser ALM F30-Rumpfsequenzen zeigen die b<sub>2</sub>-b<sub>7</sub>-Acylium-Ionen-Serie, die internen Fragment-Ionen b<sub>7</sub>y<sub>10</sub>-b<sub>7</sub>y<sub>13</sub> und die internen Fragmente y<sub>7</sub>b<sub>10</sub>-y<sub>7</sub>b<sub>13</sub>. Um die Bildung der Pyroglutamyl-Peptide durch den ESI-Prozeß auszuschließen, wurden zwei Modellpeptide



**Abbildung 16.** ESI-MS<sup>n</sup>-Spektren ( $n = 1-3$ ) von [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**). Für experimentelle Details vgl. Manuskript 3. Bezeichnung der Fragment-Ionen erfolgte entsprechend der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann [74].

synthetisiert, die einen reduzierten C-Terminus der Pyroglutamyl-Peptide darstellen und sich durch einen Glu/Pyr-Austausch in Position 1 unterscheiden (Glu-Hexapeptid, Glu-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol; Pyr-Hexapeptid, Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol). Die ESI-IT-MS<sup>3</sup>-Spektren beider Modellpeptide zeigen die b- und y-Fragment-Ionen-Serien, wobei die entsprechenden [M+H]<sup>+</sup>-Ionen als Precursor ausgewählt wurden. Im Spektrum des Glu-Hexapeptides wurden sowohl die zugehörigen b<sub>2</sub>-b<sub>4</sub>-Fragment-Ionen als auch die entsprechenden b-Fragment-Ionen abzüglich m/z 18 gefunden, was einen Wasserverlust bzw. eine Pyroglutamat-Bildung in der Ionenfalle vermuten lässt (Tabelle 8). Die gleichen b-Fragment-Ionen findet man in den ESI-IT-MS<sup>3</sup>-Spektren des Pyr-Hexapeptides, wobei allerdings die um m/z 18



**Abbildung 17.** Fragmentierungsschema für ESI-IT-MS<sup>n</sup>-Messung ( $n = 1-3$ ) von [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (**3**).

größeren Signale in diesen Spektren fehlen. Der Nachweis der Pyroglutamyl-ALM F30-Rumpfsequenzen **2** und **7** in dem untersuchten *T. viride*-Extrakt kann demnach nicht auf eine Artefaktbildung im ESI-Sprayer zurückgeführt werden, da die entsprechenden „b + 18“-Fragmente in den ESI-IT-MS<sup>n</sup>-Spektren dieser ALM F30-Komponenten nicht detektiert wurden. Darüberhinaus unterscheiden sich beide Modellpeptide in ihrem elektrophoretischen Verhalten. Wie aus der Sequenz zu erwarten war, zeigt das Glu-Hexapeptid unter den genutzten NACE-Bedingungen eine deutlich größere anodische Mobilität als das Pyr-Hexapeptid (vgl. Abschnitt 5.3.2).

**Tabelle 8.** Fragment-Ionen und Pseudomolekül-Ionen (*m/z*-Werte) der Modell-Hexapeptide Glu-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Glu-Hexapeptid) und Pyr-Aib-Val-Aib-Gly-Leuol (Pyr-Hexapeptid).

Ion	<i>m/z</i>	
	Glu-Hexapeptid	Pyr-Hexapeptid
b <sub>2</sub>	215.1	197.1
b <sub>3</sub>	314.2	296.2
b <sub>4</sub>	399.2	381.2
b <sub>5</sub>	456.2	438.2
y <sub>2</sub>	157.1	157.1
y <sub>3</sub>	242.2	242.2
y <sub>4</sub>	341.2	341.2
y <sub>5</sub>	426.3	426.3
[b <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O]	197.1	-
[b <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O]	296.2	-
[b <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O]	381.2	-
[M + H] <sup>+</sup>	573.3	555.3

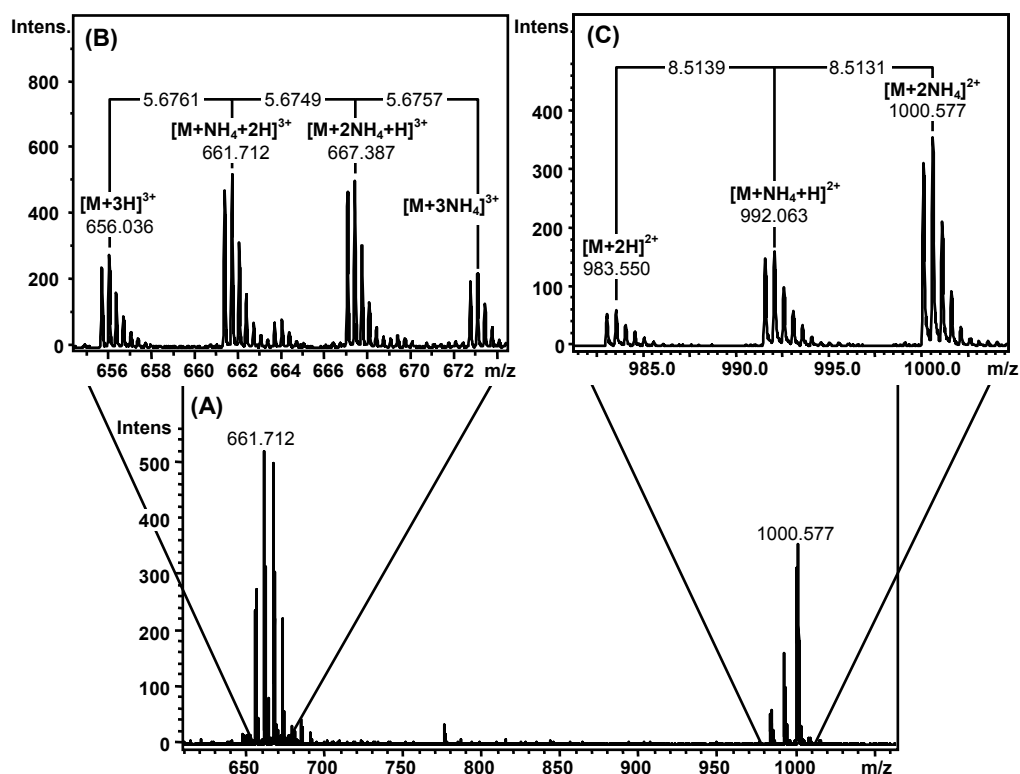
Das Vorkommen von Peptaibol-Peptiden mit einer freien Aminosäure bzw. einem Aminosäureamid am C-Terminus an Stelle eines Aminoalkohols wurde bereits bei einigen Vertretern dieser Substanzklasse beschrieben. So zeigen beispielsweise die Trichobrachine TB I A, B, C und D Glutamin [162], und die Cephaibole P und Q Serin [163] am C-Terminus. Hingegen wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal Pyroglutamyl-Peptaibole nachgewiesen. Allerdings muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob diese Peptide tatsächlich *in vivo* vom Schimmelpilz gebildet werden oder Artefakte der Aufarbeitung des Extraktes bzw. eines enzymatischen Abbaus der Peptaibole während des Fermentationsprozesses darstellen. Um eine Bildung der Pyroglutamyl-Peptide während der Probenaufbereitung auszuschließen, wurde das untersuchte ALM F30 sowohl unter den Extraktionsbedingungen [152] auf 70°C als auch im trockenen Zustand auf 100°C für 24 bzw. 41 Stunden erhitzt und anschließend mittels LC-MS und CE untersucht. Unter keiner dieser verschiedenen Stressbedingungen stieg der Gehalt der Pyroglutamyl-Peptide an, wodurch deren Bildung während des Extraktionsprozesses unwahrscheinlich erscheint.

Die Besonderheit des Nachweises von Pyroglutamyl-Peptiden in der untersuchten ALM F30-Probe liegt zusätzlich darin begründet, dass das Vorkommen von Pyroglutamat als Bestandteil mykotischer Peptide bisher nicht beschrieben wurde. Die Bildung von Peptiden mit N-terminalem Pyroglutamat ist hingegen bei Bakterien, Pflanzen, Vertebraten und Invertebraten weit verbreitet. So wurde

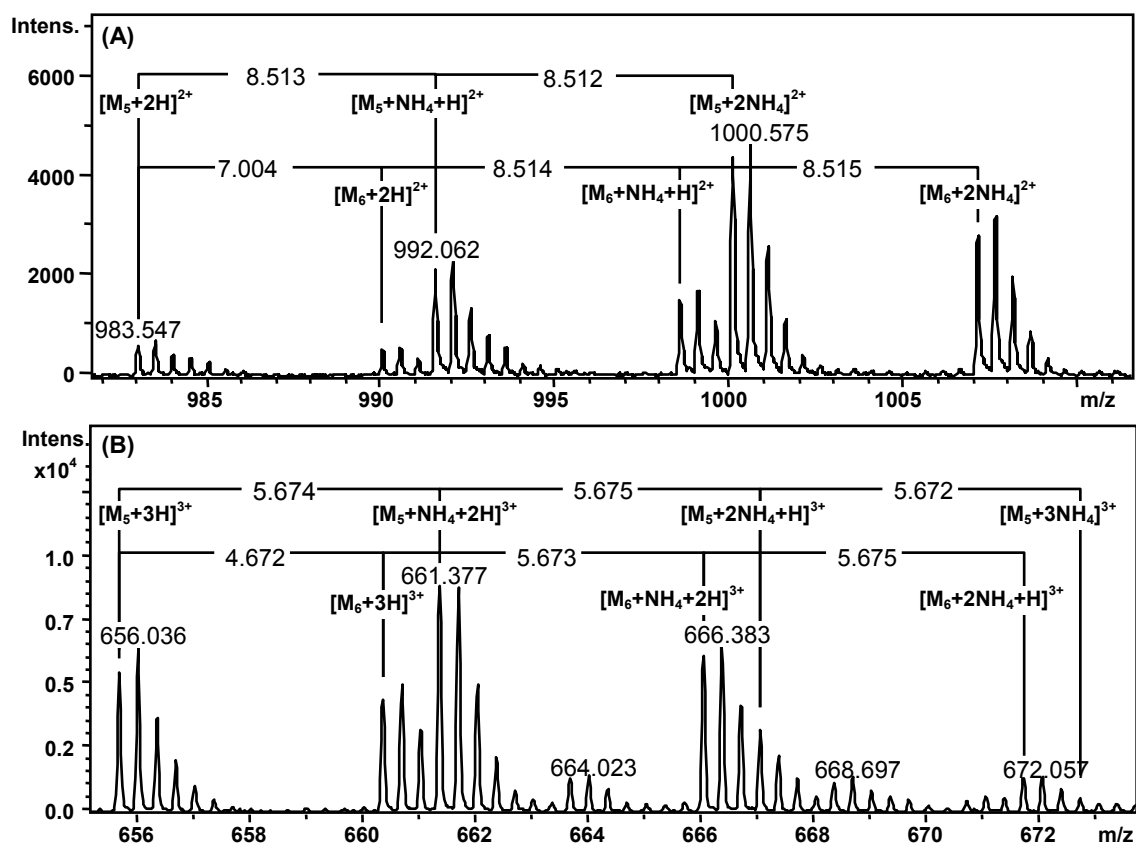
Pyroglutamat u.a. als Bestandteil antimykotischer Peptide in der Rinde von *Eucommia ulmoides* (Guttaperchabaum) [164], als Bestandteil eines adipokinetischen Hormons produziert vom Corpora cardiaca des Schmetterlings *Vanessa cardui* (Distelfalter) [165], im antimikrobiellen Peptid Gomesin der Vogelspinne *Acanthoscurria gomesiana* [166], in Peptiden, die in den Abdominalganglien Meeresschnecke *Aplysia californica* (kalifornischer Seeohr) produziert werden [167] und in Peptiden der Hemolymphe von *Penaeus vannamei* (White-Tiger-Garnele) [168] identifiziert. Darüberhinaus ist Pyroglutamat N-terminaler Bestandteil im Neurotensin des Grünfrosches *Rana ridibunda* [169] und der BPPs („**B**radikinin-**p**otenzierendes-**P**eptid“) im Gift der Schlange *Bothrops jararaca* (Jararaca-Lanzenotter) [170], die als biogene ACE-Hemmer wirken. Auch eine Vielzahl humaner, regulatorischer Peptide wie z.B. Thyreoliberin (TRH), Gastrin, Gonadoliberin (GnRH) und Neurotensin weisen N-terminal einen Pyroglutamyl-Rest auf, wobei dieser in vielen Fällen entscheidend für die Ausbildung der physiologisch aktiven Struktur ist. Außerdem kommt es durch die Pyroglutamyl-Bildung zu einer Erhöhung der enzymatischen Stabilität dieser Peptidhormone, da die basischen Eigenschaften des Peptid-N-Terminus als entscheidendem Erkennungsmerkmal für viele Aminopeptidasen verloren gegangen sind. Die Biosynthese von Pyroglutamyl-Peptiden erfolgt durch eine Zyklisierung von N-terminalen Glutaminy-Resten, katalysiert durch Glutaminy-Cyclasen (QCs) [171]. Zurzeit kann man mehr als 100 verschiedene QC-Gene in der Genom-Datenbank BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) finden, die auch mykotische Sequenzen enthält. Eine enzymatische Bildung der gefundenen ALM F30-Pyroglutamyl-Rumpfsequenzen durch *T. viride* kann daher nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen zur Herkunft dieser Pyroglutamyl-Peptaibole sind daher unerlässlich.

#### 5.3.4 NACE-ESI-TOF-MS-Messungen

Zur Bestätigung der gefundenen Aminosäuresequenzen wurde zusätzlich eine NACE-ESI-TOF-MS-Analyse durchgeführt. Die hohe Auflösung des TOF-Massenanalysators erlaubt die Bestimmung der Isotopenverteilung. Zur Kalibrierung der  $m/z$ -Skala wurde die Hauptkomponente ALM F30 (**4**) genutzt. In den erhaltenen TOF-MS-Spektren wurden vorwiegend die zwei- und dreifach geladenen Pseudomolekül-Ionen ( $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ ) detektiert. Fragmentierungen wurden nicht beobachtet. Das genutzte NACE-ESI-MS-System ist durch die Bildung von Ammoniumaddukten gekennzeichnet, die durch die Massendifferenz zum Signal des Pseudomolekül-Ions von  $m/z$  8.513 für die zweifach geladenen Spezies und  $m/z$  5.675 für die dreifach geladenen Spezies gekennzeichnet sind. Abbildung 18 zeigt das ESI-TOF-Massenspektrum von  $[Glu^7]$  ALM F30 (**11**). Es sind zwei Gruppen von Peaks zu erkennen, die den zwei- bzw. dreifach geladenen Pseudomolekül-Ionen und den dazugehörigen Mono-, Di- und im Fall des  $[M+3H]^{3+}$  sogar Triammoniumaddukten zuzuordnen sind. Die intensivsten Signale ergaben das Diammoniumaddukt ( $m/z$  1000.577) im Falle des zweifach geladenen Pseudomolekül-Ions  $[M+2NH_4]^{2+}$  und das Monoammoniumaddukt ( $m/z$  661.712) im Falle des dreifach geladenen Pseudomolekül-Ions  $[M+NH_4+2H]^{3+}$ . Diese Intensitätsverteilung ist charakteristisch für alle 19- und 20-AS-ALM F30-Komponenten.



**Abbildung 18.** ESI-TOF-Massenspektrum von  $[Glu^7]$  ALM F30. Die  $m/z$ -Bereiche für die drei- (B) und zweifach (C) geladenen Pseudomolekül-Ionen sind vergrößert. Die Massendifferenz von  $m/z$  8.513 und 5.675 entspricht der Ammoniumaddukt-Bildung für die  $[M+3H]^{3+}$ - und  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen.



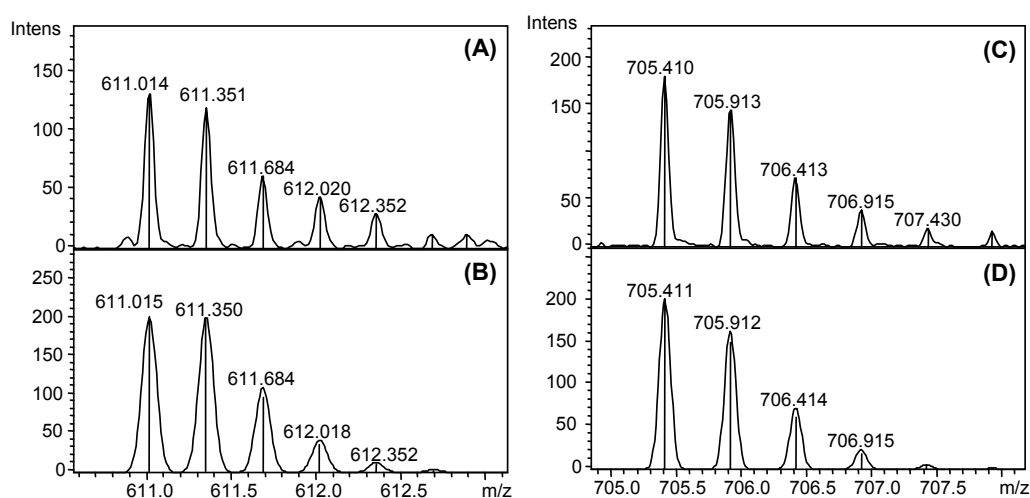
**Abbildung 19.** ESI-TOF-Massenspektrum der comigrierenden ALM F30-Komponenten  $[Glu^{19}]$  ALM F30 (5) und  $[Aib^6, Glu^{19}]$  ALM F30 (6). Die dargestellten Massendifferenzen entsprechen dem Ala/Aib-Austausch ( $m/z$  7.008 und 4.672) bzw. der Bildung von Ammoniumaddukten ( $m/z$  8.513 und 5.675).



Der Ala/Aib-Austausch kann durch die Massendifferenz von  $m/z = 7.008$  für die zwei- und  $m/z = 4.672$  für die dreifach geladenen Spezies erkannt werden. Abbildung 19 verdeutlicht die Komplexität der ESI-TOF-Spektren für comigrierende Peptide am Beispiel von  $[\text{Glu}^{19}]$  ALM F30 (**5**) und  $[\text{Aib}^6, \text{Glu}^{19}]$  ALM F30 (**6**). Die Bildung von Ammoniumaddukten und der Ala/Aib-Austausch führen zu einer Fülle von Signalen, da sich die Peaks der Ammoniumaddukte der ein- bzw. zweifach geladenen Pseudomelekül-Ionen des  $[\text{Glu}^{19}]$  ALM F30 (**5**) mit denen der  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ - bzw.  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ -Ionen des  $[\text{Aib}^6, \text{Glu}^{19}]$  ALM F30 (**6**) überschneiden.

Die ESI-TOF-Massenspektren der Pyroglutamyl-Rumpfsequenzen **2** und **7** zeigen ausschließlich Signale der zweifach geladenen Pseudomolekül-Ionen und der entsprechenden Mono- und Diammoniumaddukte, wobei die Signale für die  $[\text{M}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ -Ionen am intensivsten sind. Dreifach geladene Ionen wurden bei diesen Peptiden nicht beobachtet.

Abbildung 20 zeigt die Isotopenverteilungen des  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ -Ions von  $[\text{desPheol}]$  ALM F30 (**8**) und des  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Ions von  $[\text{desAA}(1-6), \text{Pyr}^7]$  ALM F30 (**7**) im Vergleich mit berechneten Isotopenverteilungen. Da in beiden Fällen das experimentell ermittelte Isotopenmuster mit dem berechneten übereinstimmt, bestätigt sich die Elementzusammensetzung der jeweiligen Peptaibole. Diese Vorgehensweise wurde zur Verifizierung der Elementzusammensetzung aller identifizierten ALM F30-Peptaibole genutzt. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die experimentellen monoisotopischen  $m/z$ -Werte im Vergleich zu den berechneten  $m/z$ -Werten aller Komponenten. Mit Ausnahme des neutralen ALM F50 (**1**) war die Massengenauigkeit für die  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Ionen besser als 5.0 ppm und für die  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ -Ionen besser als 2.0 ppm. Die im Vergleich zu den anderen Komponenten geringe Massengenauigkeit für ALM F50 (**1**) kann auf die sehr geringe Konzentration dieses Peptides in der untersuchten Probe und die damit verbundene geringe Signalintensität zurückgeführt werden. Vergleicht man hingegen das intensivere Signal für das Monoammoniumaddukt des ALM F50 ( $[\text{M}+\text{NH}_4+\text{H}]^{2+}$ ,  $\text{C}_{92}\text{H}_{156}\text{N}_{24}\text{O}_{24}$ ) mit dem berechneten Wert, so resultiert eine Massengenauigkeit von 5.0 ppm. Neben der Lage der Isotopensignale kann auch deren Intensität bei einem Vergleich zwischen experimentellen und



**Abbildung 20.** Gemessenes (A, C) und berechnetes (B, D) Isotopenmuster von  $[\text{desPheol}]$  ALM F30 (A, B) und  $[\text{desAA}(1-6), \text{Pyr}^7]$  ALM F30 (C, D).

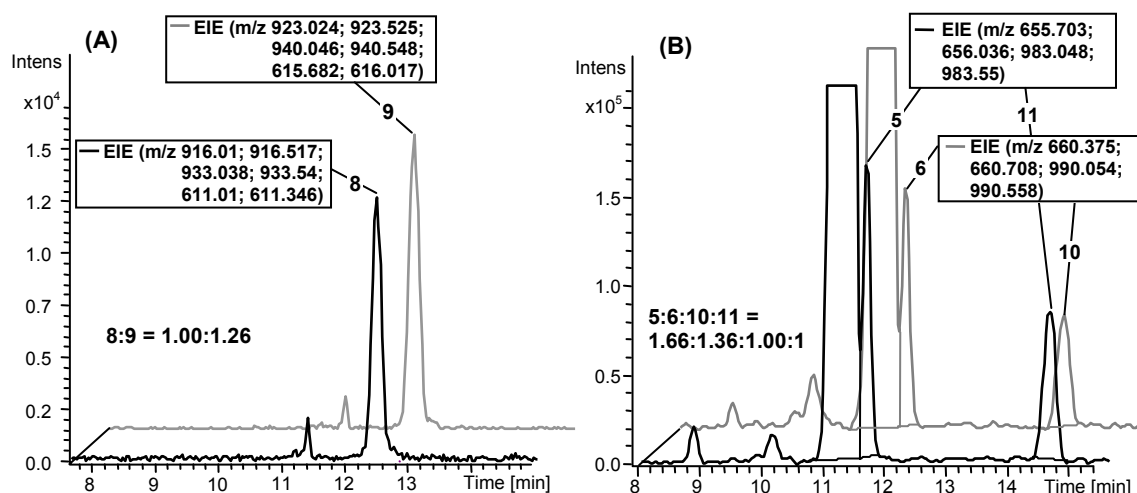
theoretischen Spektren berücksichtigt werden. So konnte beispielsweise für die neuen ALM F30-Komponenten [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (7) und [desPheol] ALM F30 (8) festgestellt werden, dass deren Elementzusammensetzung unter den ersten 10% der aufgrund des Isotopenmusters des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions theoretisch möglichen Elementzusammensetzungen liegt.

**Tabelle 9.** Gemessene und berechnete m/z-Werte der Pseudomolekül-Ionen.

		Summen- formel	monoisotop. Molekular- gew. [Da]	m/z monoisotopische Masse					
				$[M+2H]^{2+}$		$\Delta m$ [ppm]	$[M+3H]^{3+}$		$\Delta m$ [ppm]
				gemess.	berechn.		gemess.	berechn.	
1	ALM F50	C <sub>92</sub> H <sub>151</sub> N <sub>23</sub> O <sub>24</sub>	1962.09	982.0784	982.0724	+ 6.1	655.0483	655.0507	- 3.7
2	[des(1-6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F50	C <sub>67</sub> H <sub>108</sub> N <sub>16</sub> O <sub>17</sub>	1408.77	705.4107	705.4112	- 0.7	-	-	-
3	[Aib <sup>6</sup> ] ALM F30	C <sub>93</sub> H <sub>152</sub> N <sub>22</sub> O <sub>25</sub>	1977.08	989.5723	989.5722	+ 0.1	660.0507	660.0506	+ 0.2
4	ALM F30	C <sub>92</sub> H <sub>150</sub> N <sub>22</sub> O <sub>25</sub>	1963.07	Kalibrant	982.5644	-	Kalibrant	655.3787	-
5	[Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	C <sub>92</sub> H <sub>149</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1964.05	983.0562	983.0564	- 0.2	655.7075	655.7067	+ 1.2
6	[Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>19</sup> ] ALM F30	C <sub>93</sub> H <sub>151</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1978.06	990.0609	990.0642	- 3.3	660.3798	660.3786	+ 1.8
7	[des(1-6),Pyr <sup>7</sup> ] ALM F30	C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N <sub>15</sub> O <sub>18</sub>	1409.75	705.9031	705.9032	- 0.1	-	-	-
8	[desPheol] ALM F30	C <sub>83</sub> H <sub>139</sub> N <sub>21</sub> O <sub>25</sub>	1830.00	916.0177	916.0198	- 2.3	611.0148	611.0156	- 1.3
9	[Aib <sup>6</sup> ,desPheol] ALM F30	C <sub>84</sub> H <sub>141</sub> N <sub>21</sub> O <sub>25</sub>	1844.01	923.0305	923.0276	+ 3.1	615.6873	615.6875	- 0.3
10	[Aib <sup>6</sup> ,Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	C <sub>93</sub> H <sub>151</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1978.06	990.0634	990.0642	- 0.8	660.3797	660.3786	+ 1.7
11	[Glu <sup>7</sup> ] ALM F30	C <sub>92</sub> H <sub>149</sub> N <sub>21</sub> O <sub>26</sub>	1964.05	983.0557	983.0564	- 0.7	655.7066	655.7067	- 0.2

### 5.3.5 Quantifizierung der Alamethicin F30-Komponenten

Der relative Gehalt der identifizierten ALM F30-Komponenten in der mikroheterogenen Mischung ist entscheidend für die Beurteilung der Effekte struktureller Veränderungen, vor allem bei der Beurteilung biologischer Aktivitäten. Die Quantifizierung der Einzelkomponenten auf Grundlage der NACE-Elektropherogramme ist nicht möglich, da einige der ALM F30-Peptide comigrieren. Es wurden daher die NACE-UV-Ergebnisse (Detektion bei 215 nm) mit den NACE-ESI-TOF-MS-Messungen für die quantitative Bestimmung der Einzelkomponenten kombiniert. Der absolute Gehalt der comigrierenden Analytpaare und der getrennten Analyten wurde durch die Integration des NACE-UV-Elektropherogramms erhalten. Die Berechnung des relativen Gehalts der comigrierenden Komponenten zueinander basierte auf der Auswertung der EIEs (*extracted ion electropherograms*) charakteristischer Isotopensignale der Pseudomolekül-Ionen  $[M+2H]^{2+}$  und  $[M+3H]^{3+}$ . Voraussetzung für ein derartiges Vorgehen sind vergleichbare Ionisierungsausbeuten während des ESI-Prozesses für die zu vergleichenden Peptide. Es wurden daher nur Isotopensignale von Pseudomolekül-Ionen mit ähnlicher Masse und gleicher Ladung für die relative Quantifizierung herangezogen. Dabei musste sehr sorgfältig auf die Auswahl der einzelnen Isotopensignale geachtet werden, da es zu Überschneidungen zwischen den Signalen der Pseudomolekül-Ionen und der Ammoniumaddukte der comigrierenden Komponente kommen kann (vgl. Abschnitt 5.3.4). Abbildung 21A zeigt die EIEs von [desPheol] ALM F30 (8) und [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (9). Die Integration der entsprechenden Peaks ergab ein Mengenverhältnis beider Komponenten von 1.00:1.26. Die Quantifizierung der comigrierenden Glu<sup>7</sup>- und Glu<sup>19</sup>-ALM F30-Peptaibole erfolgte auf Basis der in Abbildung 21B



**Abbildung 21.** Quantifizierung von (A) [desPheol] ALM F30 (8) und [Aib<sup>6</sup>,desPheol] ALM F30 (9) und (B) [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5), [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6), [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) und [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (10) anhand charakteristischer Massenspuren der NACE-ESI-TOF-MS-Messungen. Die gezeigten Massenspuren ergeben sich aus der Addition von Isotopensignalen, die sich eindeutig einer Komponente zuordnen lassen.

gezeigten EIEs. Die Positionsisomere [Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (5) und [Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (11) bilden Pseudomolekül-Ionen mit identischen m/z-Werten und können daher beide im gleichen EIE erfasst werden. Gleiches gilt für die Positionsisomere [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>19</sup>] ALM F30 (6) und [Aib<sup>6</sup>,Glu<sup>7</sup>] ALM F30 (10). Die Auswertung der beiden EIEs in Abbildung 21B ergab ein Mengenverhältnis der vier Peptide 5, 6, 10 und 11 von 1.66:1.36:1.00:1.34. Der relative Gehalt der Pyroglutamyl-Peptide 2 und 7 und des Paares ALM F30 (4) / [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (3) wurde in ähnlicher Weise bestimmt.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung sind in Tabelle 6 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit den HPLC-MS-Ergebnissen von Brückner und Mitarbeitern [152] umfassen die Hauptkomponenten ALM F30 (4) und [Aib<sup>6</sup>] ALM F30 (3) etwa 90% des untersuchten ALM F30-Peptidgemisches. Die bisher nicht beschriebene Komponente [desAA(1-6),Pyr<sup>7</sup>] ALM F30 (7) war zu etwa 3% enthalten, während alle anderen Minorkomponenten einen Gehalt von jeweils unter 2% aufweisen. Die Bestimmung von ALM F50 (1) war nicht möglich, da diese Substanz sehr nah am EOF migriert (vgl. Abschnitt 5.3.2). Nicht-peptidische, neutrale Verunreinigungen der Probe werden vom EOF transportiert und verhindern eine eindeutige Zuordnung des UV-Signals, das zur Quantifizierung dieses neutralen Peptaibol-Peptides herangezogen werden muss.

#### 5.4 Bestimmung von Enkephalin-Peptiden mittels NACE-ED

(Manuskript 5)

In diesem Teil der Arbeit wurden die Vorteile nichtwässriger Lösungsmittel für die CE mit elektrochemischer Detektion (ED) am Beispiel der Bestimmung von Enkephalin-Peptiden genutzt. Enkephaline sind Neuropeptide, die als endogene Liganden der Opioid-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung der Schmerzwahrnehmung in akuten Stresssituationen spielen. Im Gehirn wirken Met-Enkephalin (ME) und Leu-Enkephalin (LE) als Neurotransmitter und Neuromodulatoren. Weiterhin sind die Enkephalin-Peptide an der Regulation wichtiger physiologischer Prozesse wie der Darmmotilität, der Atmung, der Körpertemperatur, der Steuerung von Lernprozessen und der Regulation der Hormonsekretion beteiligt [172]. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die endogenen Konzentrationen verschiedener Opioid-Peptide mit dem Auftreten eines humanen Hypophysentumors korrelieren [173]. Allerdings sind trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Opioid-Peptide viele klinische und pharmakologische Aspekte dieser Stoffgruppe noch nicht vollständig geklärt.

Die Bestimmung dieser Neuropeptide in biologischem Material stellt eine besondere Herausforderung dar, da sie in sehr geringer Konzentration vorliegen. Immunologische Analysenverfahren wie der Radioimmunoassay (RIA) oder der Chemolumineszenzimmunoassay (CLIA) erlauben eine sehr empfindliche Bestimmung dieser Substanzen in biologischen Proben. Allerdings limitieren auftretende Kreuzreaktivitäten (geringe Spezifität), die relativ hohen Kosten der Einweg-Kits und beim RIA die schwierige Handhabung der radioaktiven Materialien (z.B.  $^{125}\text{I}$ ) den Einsatz dieser Methoden. Neben diesen immunologischen Analyseverfahren hat die Massenspektrometrie zur Analytik von Neuropeptiden in biologischen Realproben eine große Bedeutung erlangt, da sich MS-Methoden sowohl durch eine hohe Spezifität als auch durch eine hohe Empfindlichkeit auszeichnen. So sind verschiedene MALDI-TOF-MS- und die HPLC-MS-Verfahren für die Bestimmung von Opioid-Peptiden aus biologischem Material beschrieben [173, 174]. In jüngster Zeit wurden auch CE-MS-Verfahren zur Analytik dieser Peptide in bovinen Hypophysen und Primatenhirngewebe genutzt [175-177].

Die elektrochemische Aktivität der Enkephalin-Peptide (vgl. Abschnitt 2.3.2) macht auch amperometrische Detektionsverfahren für deren Analytik interessant. HPLC-ED-Verfahren erlauben sehr empfindliche und spezifische Bestimmung dieser Tyrosin-enthaltenden Peptiden. Der große Vorteil elektrochemischer Detektionsverfahren gegenüber den anderen Methoden, die zur Analytik dieser Neuropeptide genutzt werden, wie RIA und MS, ist der relativ geringe instrumentelle Aufwand. Von verschiedenen Autoren wurden HPLC-ED-Methoden zur Bestimmung von Enkephalin-Peptiden in Hirngewebe beschrieben [178, 179]. Lunte und Mitarbeiter entwickelten eine CE-ED-Methode zur Bestimmung von LE und seiner proteolytischen Abbauprodukte aus einer gespikten Plasmaprobe zur Charakterisierung der enzymatischen Stabilität dieses Neuropeptides [84]. Die Autoren nutzten dabei die Möglichkeit der elektrochemischen Detektion von Peptid-Kupfer(II)-Komplexen (vgl. Abschnitt 2.3.2). Ein Vergleich der Bestimmungsgrenzen ergab, dass die Bestimmung des Kupfer(II)-Komplexes des LE eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor zwei gegenüber dem nativen, elektroaktiven Neuropeptid ermöglicht. Außerdem konnten durch die Kupfer(II)-Komplexierung auch elektrochemisch

inaktive Spaltprodukte erfasst werden. Die beschriebene CE-ED-Methode erlaubt die quantitative Bestimmung von 0.50  $\mu\text{M}$  LE als Kupfer(II)-Komplex und von 0.98  $\mu\text{M}$  in nativer Form bei einem Signal-Rausch-Verhältnis  $S/N = 3$ .

In der vorliegenden Arbeit wurde eine NACE-ED-Methode zur Bestimmung von ME und LE entwickelt, wobei eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der UV-Detektion im Vordergrund stand. Die Optimierung der elektrochemischen Detektionsbedingungen erfolgte mit Hilfe der *capillary batch injection analysis* (CBIA)-Technik. Die praktische Anwendbarkeit der entwickelten Methode wurde anhand der Bestimmung der Enkephalin-Peptide in gespickten Plasmaproben gezeigt.

#### 5.4.1 Optimierung der NACE-Trennmethode in unmodifizierten Quarzkapillaren

Da Acetonitril aufgrund seiner idealen physikochemischen Eigenschaften für die elektrochemische Detektion gut geeignet ist (vgl. Abschnitt 2.5.5), war es das Ziel der Trennoptimierung, Puffer mit einem hohen Anteil dieses Lösungsmittels für eine Trennung der Analyten zu verwenden. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Enkephalin-Peptide in Acetonitril, wurde auf NACE-Puffer in Acetonitril/Methanol-Mischungen zurückgegriffen. Dabei war es wichtig, die Methanol-Konzentration so gering wie möglich zu halten, da dieses Lösungsmittel an der Arbeitselektrode oxidiert werden kann und dadurch den ED-Grundstrom erhöht.

Der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung der Puffer (Acetonitril/Methanol-Verhältnis) auf die Trennung der Enkephalin-Peptide wurde mit den in Tabelle 10 angegebenen Elektrolytsystemen untersucht. Abbildung 22 zeigt die Trennung von LE, ME und dem internen Standard [D-Ala<sup>2</sup>]-Leu-Enkephalin (IS) in verschiedenen NACE-Puffern. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Mobilitäten und die Trenneffizienz-Parameter, die bei Verwendung der drei Elektrolytsysteme in verschiedenen Acetonitril/Methanol-Mischungen erhalten wurden. Die beste Auflösung der positiv geladenen Analyten wurde in reinem Methanol mit dem Elektrolytsystem 25 mM Ammoniumacetat/1M Essigsäure erhalten (Abbildung 22A). Die schnellste Trennung der drei Analyten und der beste  $N/m$ -Wert wurden in Acetonitril/Methanol (1:1, v/v) mit dem gleichen Elektrolytsystem erhalten. Mit einem Anstieg der Acetonitril-Konzentration sinkt die effektive Mobilität der protonierten Peptide. Dies kann auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden. Zum einen wird durch die Zugabe des schwach basischen dipolar aprotischen Lösungsmittels Acetonitril die Protonierung der Analyten erschwert. Zum anderen sind Homo- und Heterokonjugations-Phänomene in Acetonitril deutlicher ausgeprägt [159], wodurch ebenfalls die effektive Mobilität verringert wird. Zusätzlich erhöht sich mit zunehmender Acetonitril-Konzentration das  $\varepsilon/\eta$ -Verhältnis, woraus eine erhöhte EOF-Mobilität und damit kürzere Analysenzeiten resultieren. Die Trennung der Peptide in den stärker sauer reagierenden Ameisensäure-Puffern wurde nur in sehr geringem Ausmaß von der Lösungsmittelzusammensetzung beeinflusst (Tabelle 10, Abbildung 22C).

**Tabelle 10.** Analytmobilitäten und Trenneffizienz-Parameter der NACE-Analyse von Met-Enkephalin (ME) und Leu-Enkephalin (LE) unter Verwendung von drei festen Elektrolytsystemen in Methanol und verschiedenen Acetonitril/Methanol-Mischungen. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 5. MeOH-Methanol, ACN-Acetonitril.

Lösungs- mittelsystem	25 mM Ammoniumacetat, 1M Essigsäure							25 mM Ammoniumacetat, 0,5 M Ameisensäure							25 mM Ammoniumacetat						
	$\mu^a)$ [10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]			$r^b)$	$R_s^c)$	$t_a^d)$ [min]	N/m <sup>e)</sup>	$\mu^a)$ [10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]			$r^b)$	$R_s^c)$	$t_a^d)$ [min]	N/m <sup>e)</sup>	$\mu^a)$ [10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]			$r^b)$	$R_s^c)$	$t_a^d)$ [min]	N/m <sup>e)</sup>
	EOF	ME	LE					EOF	ME	LE					EOF	ME	LE				
MeOH (100%)	4.38	5.30	6.56	1.24	11.2	13.0	410 020	5.63	9.46	9.87	1.04	2.6	8.4	421 413	7.49	-7.86 <sup>f)</sup>	-7.71 <sup>f)</sup>	1.02 <sup>f)</sup>	0.9 <sup>f)</sup>	-	-
ACN/MeOH (1:3, v/v)	14.93	5.34	6.89	1.29	8.1	6.2	510 718	15.54	11.05	11.63	1.05	4.6	4.8	445 685	21.02	-11.40	-10.40	1.10	6.2	13.3	122.535
ACN/MeOH (1:1, v/v)	23.84	3.61	5.09	1.41	6.3	4.6	534 288	23.01	10.82	11.56	1.07	4.0	3.7	331 618	34.38	-13.24	-11.95	1.11	4.8	5.9	133 025
ACN/MeOH (3:1, v/v)	31.90	0.97	1.82	1.88	3.5	3.9	496 950	28.93	10.19	10.91	1.07	3.3	3.3	405 443	49.07	-13.30	-11.71	1.14	3.5	3.4	244 728

a) Effektive (ME, LE) bzw. elektroosmotische (EOF) Mobilität.

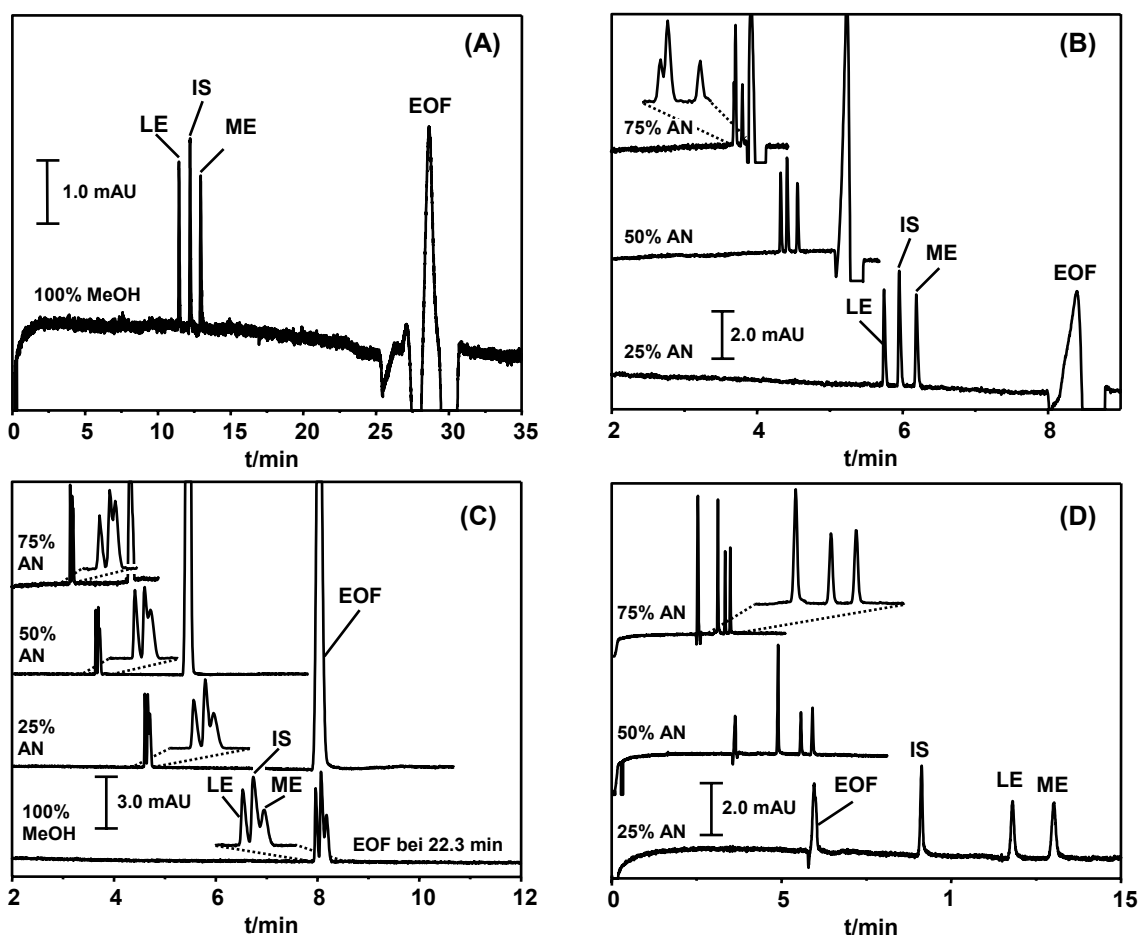
b) Selektivitätskoeffizient,  $r = \mu_1/\mu_2$ ,  $\mu_1 > \mu_2$ , wobei  $\mu_1$  und  $\mu_2$  die Werte für die effektive Mobilität der Analyte darstellen.

c) Auflösung ( $R_s$ ) zwischen LE und ME.  $R_s$  wurde entsprechend  $R_s = 1.18 (t_2 - t_1) / (W_{0.5/1} + W_{0.5/2})$  berechnet, wobei  $t_1$  und  $t_2$  die Migrationszeiten und  $W_{0.5/1}$  und  $W_{0.5/2}$  die Peakbreiten auf halber Höhe für den ersten bzw. zweiten Peak darstellen.

d) Analysenzeit

e) Anzahl theoretischer Böden für LE, wobei  $N$  entsprechend  $N = 5.54 (t_m/W_{0.5})^2$  berechnet wurde,  $t_m$  – Migrationszeit,  $W_{0.5}$  – Peakbreite auf halber Höhe.

f) Ergebnisse wurden unter Verwendung von PEG-beschichteten Kapillaren erhalten.

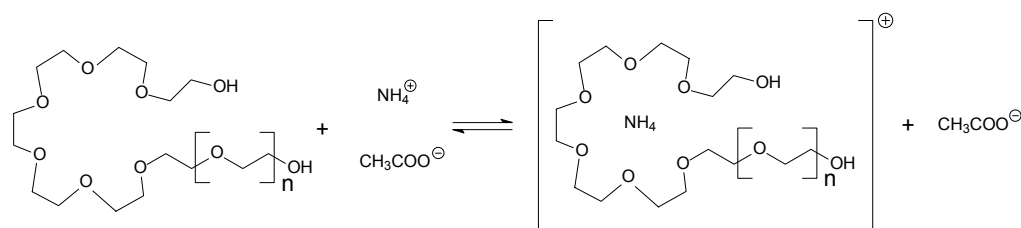


**Abbildung 22.** Einfluss des Acetonitril-Gehaltes in Acetonitril/Methanol-Mischungen auf die Trennung von ME, LE und IS bei Verwendung folgender fester Elektrolytsysteme: (A, B) 25 mM Ammoniumacetat/1 M Essigsäure, (C) 25 mM Ammoniumacetat/0.5 M Ameisensäure und (D) 25 mM Ammoniumacetat. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 5.

Die Trennung von ME und LE als deprotonierte, negativ geladene Spezies in wässrigen CE-Puffern ist nicht möglich [92, 180]. Hingegen gelang die *counter*-elektroosmotische Trennung (Trennung nach dem EOF-Peak) der deprotonierten Peptide in 25 mM Ammoniumacetat als Elektrolyt in allen untersuchten Acetonitril/Methanol-Mischungen (Abbildung 22D). Der größte Selektivitätskoeffizient ( $r$ ) und der größte N/m-Wert wurde für Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) erhalten (Tabelle 10). Im Gegensatz zu den sauren NACE-Puffern erhöht sich die effektive Mobilität der Analyten mit steigender Acetonitril-Konzentration, was auf das steigende  $\epsilon/\eta$ -Verhältnis zurückzuführen ist. Außerdem ist in Acetonitril die Deprotonierung der Analyten begünstigt. Die *counter*-elektroosmotische Trennung von ME, LE und IS in unmodifizierten Quarzkapillaren unter Verwendung eines auf reinem Methanol basierenden Puffers gelang nicht, da sowohl die EOF-Mobilität als auch die Analyt-Mobilität zu gering waren (Tabelle 10).

#### 5.4.2 Co-elektroosmotische Trennung in PEG-Kapillaren

Eine erfolgreiche elektrochemische Detektion ist nur mit den deprotonierten, negativ geladenen Peptiden möglich (vgl. Abschnitt 5.4.4). Im Hinblick auf die Bestimmung von biologischen Proben war daher eine *co*-elektroosmotische Trennung der deprotonierten Peptide erforderlich, da ungeladene Verunreinigungen, die durch den EOF transportiert werden (z.B. Wasser), zu einer Verschmutzung

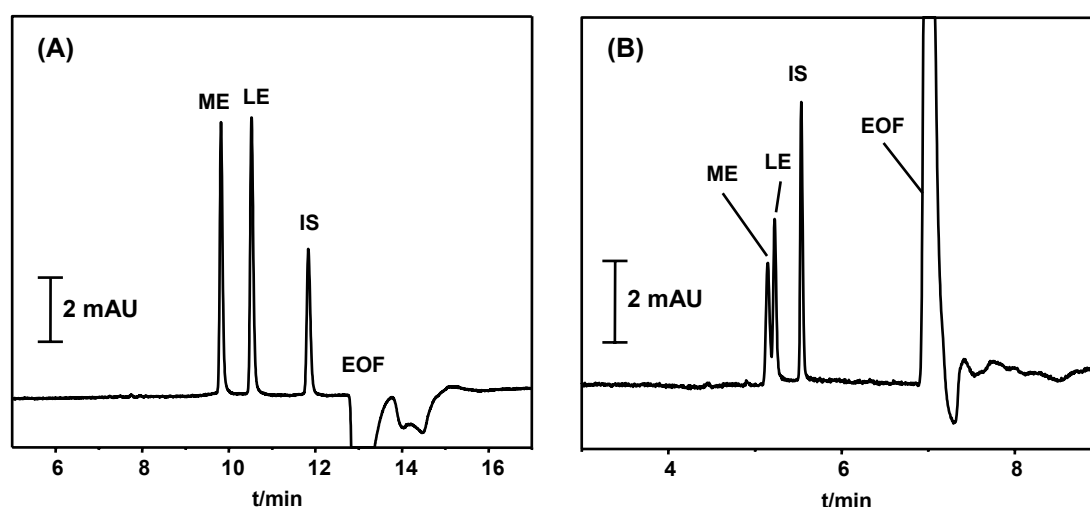


**Abbildung 23.** Komplexierung der Elektrolytkationen durch PEG der Kapillarbeschichtung [183, 184].

bzw. Inaktivierung der Detektionselektrode (*electrode fouling*) führen. Migrieren die Peptide hingegen vor dem EOF können diese Probleme vermieden werden.

Belder und Mitarbeiter haben die Verwendung von Polyethylenglycol-beschichteten Kapillaren (PEG-Kapillaren) in Methanol- oder Acetonitril-basierten Puffern zur EOF-Umkehr beschrieben [181, 182]. Aufgrund der Komplexierung der Elektrolytkationen durch PEG wird die Kapillaroberfläche positiv aufgeladen, was zur Ausbildung eines anodischen EOF führt. Die Wechselwirkung zwischen den Elektrolytkationen und PEG (Abbildung 23) ist vergleichbar mit der Komplexierung von Kationen durch Kronenether [183, 184]. Die Beobachtung, dass diese EOF-Umkehr nur in nichtwässrigen Puffersystemen auftritt, während man in wässrigen CE-Puffern nur eine Verringerung der EOF-Mobilität erhält [182], ist mit der deutlich besseren Solvatisierung der Kationen in Wasser zu erklären. In Methanol- bzw. Acetonitril-basierten Puffern ist die elektroosmotische Mobilität bei der Verwendung dieser PEG-Kapillaren abhängig von der Art des Kations und korreliert mit dessen Komplexbildungskonstante. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von PEG-Kapillaren ist die verbesserte Reproduzierbarkeit der elektroosmotischen Mobilität im Vergleich zu unbehandelten Quarzkapillaren. Außerdem sind aufwendige Spülschritte zur Konditionierung der Kapillare nicht erforderlich [185].

Die Trennung der deprotonierten Enkephalin-Peptide gelang in PEG-Kapillaren unter Verwendung von 10 mM Lithiumacetat/50 mM Essigsäure in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) (Abbildung 24A). Im Vergleich zu der Trennung der negativ geladenen Enkephalin-Peptide ME und LE in unbehandelten



**Abbildung 24.** NACE-UV-Elektropherogramme der deprotonierten Enkephalin-Peptide unter Verwendung von PEG-Kapillaren (I.D. 75  $\mu\text{m}$ ). Experimentelle Bedingungen: Elektrolytsysteme, (A) 10 mM Lithiumacetat/50 mM Essigsäure in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v), (B) 10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v); Trennspannung, (A) -30 kV (10.1  $\mu\text{A}$ ), (B) -20 kV (4.9  $\mu\text{A}$ ); Kapillardimensionen, (A) 57/50 cm, (B) 67/60 cm.

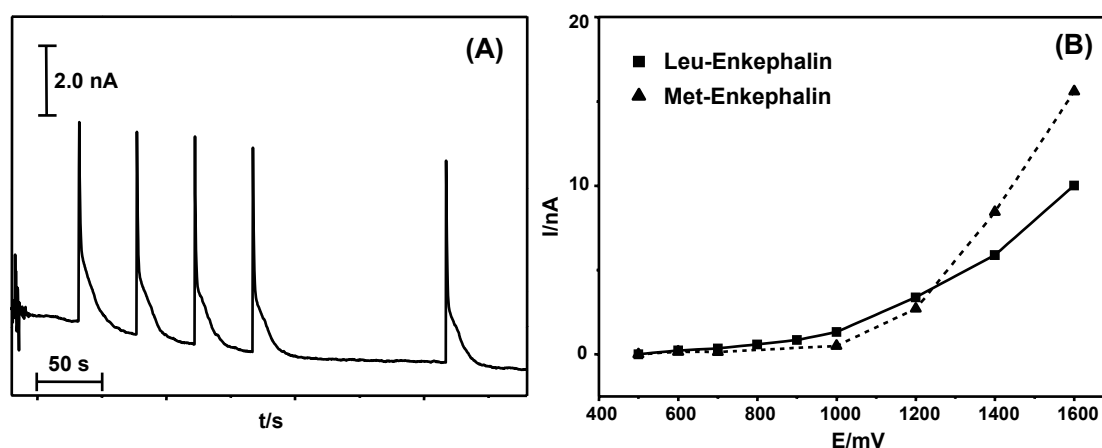


Quarzkapillaren wurden in den PEG-Kapillaren größere Selektivitätskoeffizienten erhalten ( $r_{\max} = 1.31$  in PEG-Kapillaren vs.  $r_{\max} = 1.14$  in unbehandelter Quarzkapillaren). 25mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) konnte für eine erfolgreiche co-elektroosmotische Trennung der Enkephaline in den PEG-Kapillaren nicht genutzt werden, da Ammoniumionen einen zu starken anodischen EOF induzieren (Abbildung 24B). Durch die Verwendung von Elektrolytkationen, die schwächer vom PEG-coating komplexiert werden, wie z. B. Lithiumkationen [182], kann eine Reduktion des EOF und damit eine Trennung der deprotonierten Peptide erreicht werden.

### 5.4.3 CBIA-ED

Die elektrochemische Charakterisierung der Enkephalin-Peptide erfolgte mit Hilfe von CBIA-ED-Messungen. Diese Messungen beruhen auf der wiederholten Injektion von Nanoliter-Proben direkt auf die Detektionselektrode, wodurch man Peak-förmige Signale erhält [186]. Die Probe wird dazu in eine 100- $\mu\text{m}$ -I.D.-Kapillare aufgezogen, die mit einer 10- $\mu\text{l}$ -Spritze verbunden ist. Die Injektion der Proben erfolgt durch ein elektronisch gesteuertes Dosiersystem, das mit dem Kolben der Spritze verbunden ist. Dadurch wird der Ausstoß gleichförmiger Injektionsvolumina in die Detektionszelle gewährleistet. Für die CBIA-ED- und CE-ED-Messungen wurde die gleiche elektrochemische Detektionszelle genutzt (vgl. Abschnitt 5.4.4), um vergleichbare Detektionsbedingungen zu schaffen. Mit Hilfe der CBIA Technik können neben dem elektrochemischen Verhalten der Analyten an der Detektionselektrode wichtige Charakteristika der ED wie Wiederholpräzision, Auftreten von Inaktivierungsphänomenen oder Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) untersucht werden. Im Vergleich zur CE-ED ist die Bestimmung dieser wichtigen Detektionsparameter mittels CBIA-ED deutlich schneller und einfacher durchführbar.

Abbildung 25A zeigt beispielhaft die Aufzeichnung einer CBIA-ED-Messung nach wiederholter Injektion von 172 nl einer 49  $\mu\text{M}$  LE-Lösung im o.a. nichtwässrigen Lithiumacetat-Puffersystem. Zur elektrochemischen Charakterisierung der Analyten wurden hydrodynamische Voltammogramme aufgenommen, die die Abhängigkeit des Peaksignals bzw. des amperometrischen Stromes vom angelegten Detektionspotenzial unter hydrodynamischen Bedingungen darstellen. Abbildung 25B

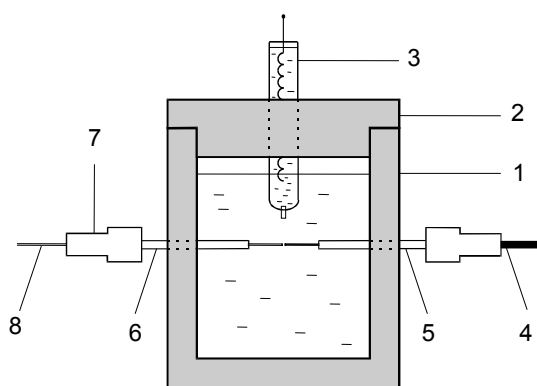


**Abbildung 25.** Signale für die Bestimmung von Leu-Enkephalin mittels CBIA-ED bei einem Detektionspotenzial von +1.4 V (A) und hydrodynamische Voltammogramme für Leu- und Met-Enkephalin (B), wobei  $I$  der Stromstärke im Peakmaximum entspricht. Für weitere experimentelle Details vgl. Manuskript 5.

zeigt die hydrodynamischen Voltammogramme für ME und LE, die mittels CBIA-ED in 10 mM Lithiumacetat/50 mM Essigsäure in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) erhalten wurden. Beide Peptide unterliegen bei Potenzialen über +0.6 V einer elektrochemischen Oxidation. Wird das angelegte Potenzial von +1.20 V auf +1.80 V angehoben kommt es sowohl zu einem sehr starken Anstieg der Signalintensität als auch zu einem erhöhten Grundstrom und einem verstärkten Basislinienrauschen. Basierend auf der Auswertung der S/N-Daten und der Reproduzierbarkeit der Detektion kann festgestellt werden, dass ein Detektionspotenzial von +1.40 V für die Detektion der Enkephalin-Peptide unter hydrodynamischen Bedingungen in dem untersuchten nichtwässrigen Elektrolytsystem am besten geeignet ist.

#### 5.4.4 NACE-ED

Die elektrochemische Zelle für die NACE-ED-Experimente ist schematisch in Abbildung 26 dargestellt. Die *end-column* Detektionszelle besteht aus einem zylindrischen Teflon-Gefäß und enthält die Arbeitselektrode und eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode, die mit 10 mM Natriumacetat/1 M Essigsäure in Acetonitril gefüllt ist. Alle angegebenen Potenziale wurden gegen dieses Referenzsystem gemessen. Wird eine Hochspannung von +25 kV an die Kapillare angelegt kommt es zu einer Verschiebung des Potenzials um 300 mV zu negativeren Potenzialen. Diese in Gegenwart einer Hochspannung auftretende Potenzialverschiebung muss bei der Wahl eines geeigneten Detektionspotenzials berücksichtigt werden. Als Arbeitselektrode wurde eine scheibenförmige Platin-Mikroelektrode mit einem Durchmesser von 60 µm genutzt. Arbeitselektrode und Trennkapillare sind vertikal in der Detektorzelle angeordnet und werden durch Edelstahlkapillaren in die Zelle geführt, wobei eine der beiden Edelstahlführungen als Gegenelektrode und Massepotenzial genutzt wird. Der Abstand zwischen Kapillarauslass und Detektionselektrode entspricht etwa dem Kapillarinne Durchmesser (75 µm), wodurch eine minimale Peakdispersion gewährleistet ist [45]. Der Einsatz eines elektrischen Entkopplers war nicht erforderlich. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass der große Vorteil des Einsatzes nichtwässriger Lösungsmittel für die CE-ED in der Möglichkeit einer Entkoppler-freien *end-column* Detektion bei Verwendung von Trennkapillaren bis zu 75 µm Innendurchmesser liegt (vgl. Abschnitt 2.5.5).



**Abbildung 26.** Schematische Darstellung der ED-Detektionszelle [112]. 1, PTFE-Zellkörper; 2, PTFE-Deckel; 3, Referenzelektrode; 4, Anschluss für die Arbeitselektrode; 5, Edelstahlführung für die Arbeitselektrode; 6, Edelstahlführung für die Trennkapillare; 7, PTFE-Adapter zur Fixierung der Trennkapillare; 8, Trennkapillare.

Die Verwendung saurer Puffersysteme zur NACE-ED-Analyse, die zu einer co-elektroosmotischen Trennung der Peptide in unbehandelten Quarzkapillaren genutzt werden können, führte zu schwachen, nichtlinearen ED-Signalen. Hingegen war die NACE-ED-Analyse der Enkephalin-Peptide als Anionen im oxidativen Modus nach *counter*-elektroosmotischer Trennung unter Verwendung von

25 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) möglich. Auch bei der in der Literatur beschriebenen wässrigen CE-ED Bestimmung von LE wurde ein alkalisches Puffersystem genutzt [84]. Möglicherweise ist der Ladungszustand der Enkephalin-Peptide entscheidend für eine erfolgreiche CE-ED-Bestimmung dieser Analyten. Eine weitere Erklärung dieser Ergebnisse könnte der Anstieg des Oxidationspotenzials von Tyrosin mit sinkendem pH-Wert sein, der für wässrige Elektrolytsysteme beschrieben ist [187].

Im Hinblick auf eine möglichst empfindliche Detektion wurde die Elektrolytkonzentration des nichtwässrigen Puffersystems verringert. Durch den dadurch verringerten elektrophoretischen Strom sinkt dessen Einfluss auf die elektrochemische Detektionszelle, woraus wiederum ein geringeres Rauschniveau resultiert. Darüberhinaus führt eine Verdünnung des Puffers nach Gleichung 7 auch zu einem Anstieg der EOF-Mobilität und damit zu kürzeren Analysenzeiten. In den folgenden NACE-ED-Experimenten wurde daher 10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) als Elektrolytsystem für die Trennung der Enkephaline in den unbehandelten Quarzkapillaren verwendet.

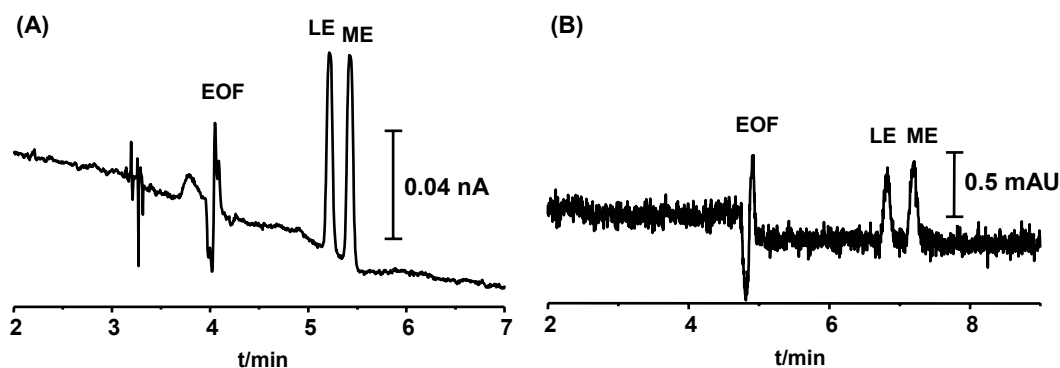
**Tabelle 11.** Abhängigkeit der Peakhöhe von der Analytkonzentration für die NACE-ED-Bestimmung von Leu- und Met-Enkephalin im Konzentrationsbereich von 0.2 – 8.0  $\mu\text{M}$  und Vergleich der Bestimmungsgrenzen (LOD) zwischen NACE-ED und NACE-UV (215 nm). Für weitere experimentelle Details vgl. Manuskript 5.

Analyt	Anstieg [pA/ $\mu\text{M}$ ]	Achsen- abschnitt [pA]	Korrelations- koeffizient (n = 10)	LOD <sup>a)</sup> (NACE-ED) [ $\mu\text{M}$ ]	LOD <sup>a)</sup> (NACE-UV) [ $\mu\text{M}$ ]
Leu- Enkephalin	15.36 $\pm$ 0.31	0.99 $\pm$ 1.06	0.998	0.3	3.3
Met- Enkephalin	16.36 $\pm$ 0.45	2.54 $\pm$ 1.51	0.997	0.3	3.2

<sup>a)</sup> Die Bestimmungsgrenze (LOD) wurde basierend auf einem S/N-Verhältnis von 3 berechnet.

Basierend auf der Analyse der S/N-Daten bei verschiedenen Detektionspotenzialen wurde +0.65 V (*actual potential*) als optimales Detektionspotenzial für die NACE-ED im *counter*-elektroosmotischen Modus gewählt. Unter Berücksichtigung der negativen Verschiebung des Detektionspotenzials der Arbeitselektrode um 300 mV bei Anlegen einer Hochspannung von +25 kV wurde während der Analyse ein Potenzial von +0.95 V (*applied potential*) angelegt. Die Abhängigkeit der Höhe des amperometrischen Detektorsignals von der Analytkonzentration wurde im Bereich von 0.2  $\mu\text{M}$  bis 400  $\mu\text{M}$  untersucht. Die Kalibrierdaten für den Konzentrationsbereich von 0.2 – 8.0  $\mu\text{M}$  sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Bei Analytkonzentrationen über 50  $\mu\text{M}$  ist kein linearer Zusammenhang zwischen Signalintensität und Konzentration gegeben. Außerdem beeinflusst bei höheren Analytkonzentrationen der zuerst detektierte Analyt (LE) die Elektrodenreaktion des zweiten (ME), was an einer starken Abflachung der Kalibrierfunktion für ME zu erkennen ist. Diese Beobachtung wurde durch eine Einzelinjektion von 131  $\mu\text{M}$  ME bestätigt, die ein deutlich größeres Signal lieferte als die Coinjektion von 131  $\mu\text{M}$  ME und 134  $\mu\text{M}$  LE.

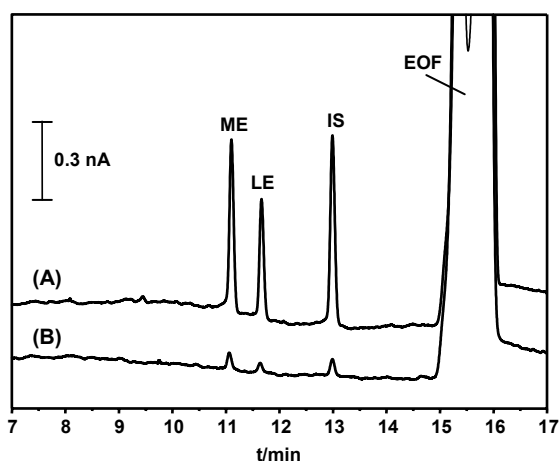
Abbildung 27 zeigt die Vorteile der ED gegenüber der UV-Detektion in bezug auf die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD). Die LODs für die ED von ME und LE sind im Vergleich zur UV-Detektion ( $\lambda =$



**Abbildung 27.** (A) NACE-ED- und (B) NACE-UV-Elektropherogramme von 4.9  $\mu\text{M}$  Leu- und 4.7  $\mu\text{M}$  Met-Enkephalin unter Verwendung unmodifizierter Quarzkapillaren. Experimentelle Bedingungen: Elektrolytsystem, (A, B) 10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v); Kapillardimensionen, (A) 68 cm x 75  $\mu\text{m}$  I.D., (B) 76/60 cm x 75  $\mu\text{m}$  I.D.; Injektionsvolumen, (A, B) 49 nl. Für weitere experimentelle Details vgl. Manuskript 5.

215 nm) um etwa eine Zehnerpotenz kleiner (Tabelle 11). Vergleicht man die Bestimmung von LE mittels NACE-ED und wässriger CE-ED, bei der LODs von 0.98  $\mu\text{M}$  für das native Peptid und 0.50  $\mu\text{M}$  für den Biuret-Komplex erhalten wurden [84], so kann festgestellt werden, dass die NACE-ED bezüglich der Empfindlichkeit der Detektion kein Vorteil bietet. Allerdings ist der instrumentelle Aufwand bei der wässrigen CE-ED deutlich erhöht, da ein Hochspannungsentkoppler eingesetzt werden muss. Außerdem ist eine Trennung von ME und LE als deprotonierte Spezies im wässrigen Milieu nicht möglich [92, 180].

Die NACE-ED-Bestimmung der deprotonierten Peptide nach co-elektroosmotischer Trennung unter Verwendung der PEG-Kapillaren war ebenfalls möglich. Abbildung 28 zeigt typische NACE-ED-Elektropherogramme der Enkephalin-Peptide im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich wobei das Lithiumacetat-Puffersystem in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v) zum Einsatz kam. Ein Detektionspotenzial von +1.0 V ergab für dieses System ein optimales S/N-Verhältnis. Im Gegensatz zu den counter-elektroosmotischen NACE-ED-Analysen kommt es beim Anlegen einer Trennungsspannung von -20 kV zu einer Verschiebung des Detektionspotenzials um 300 mV hin zu positiveren Werten. Um ein Detektionspotenzial von +1.0 V zu erhalten (*actual potential*), muss daher während der NACE-ED Analyse ein Potenzial von +0.7 V an der Arbeitselektrode angelegt werden (*applied potential*).

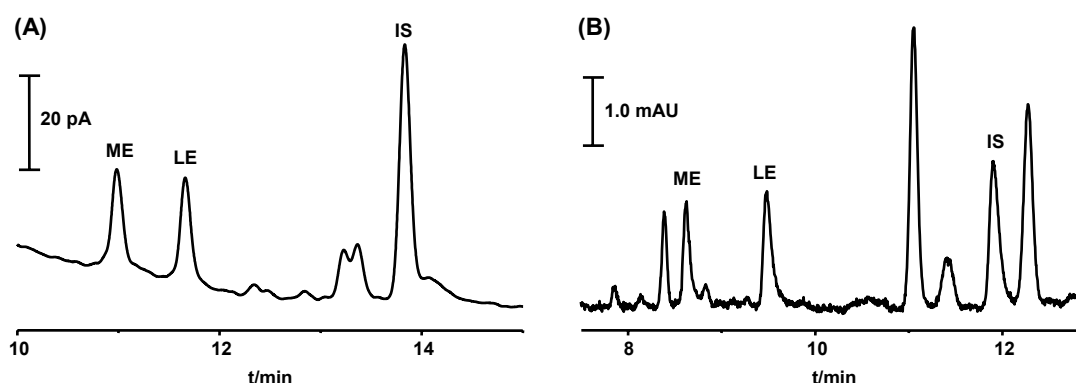


**Abbildung 28.** NACE-ED-Elektropherogramme unter Verwendung von PEG-Kapillaren. Analytkonzentrationen, (A) ME, 5.60  $\mu\text{M}$ , LE, 4.73  $\mu\text{M}$ , IS, 5.32  $\mu\text{M}$  und (B) ME, 0.56  $\mu\text{M}$ , LE 0.47  $\mu\text{M}$ , IS 0.53  $\mu\text{M}$ . Für weitere experimentelle Details vgl. Manuskript 5.

#### 5.4.5 Bestimmung der Enkephalin-Peptide in gespikten Plasmaproben

Die Eignung der NACE-ED für die Analyse von Enkephalinen in biologischen Proben wurde anhand gespikter Humanplasmaproben untersucht. [D-Ala<sup>2</sup>]-Leu-Enkephalin (IS) wurde als interner Standard genutzt, um eine unvollständige Extraktion, Injektionsfehler und kleinere Schwankungen der Migrationszeiten zu korrigieren. Als Enkephalin-Analogon besitzt dieses unphysiologische Peptid sowohl vergleichbare elektrochemische Eigenschaften als auch ein ähnliches Extraktionsverhalten bei der Festphasenextraktion (*solid phase extraction*) wie die Zielanalyten. Die NACE-ED-Messungen der Plasmaextrakte erfolgte unter Verwendung der PEG-Kapillaren und des Elektrolytsystems 2 mM Lithiumacetat/10 mM Essigsäure in Acetonitril/Methanol (3:1, v/v). Die Kalibrierung dieses NACE-ED-Systems im Konzentrationsbereich von 1.2 – 8.0 µM für LE bzw. 1.2 – 7.6 µM für ME und einer IS-Konzentration von 6.2 µM ergab einen linearen Zusammenhang zwischen den korrigierten Flächenverhältnissen ( $A_{ME}/A_{IS}$  bzw.  $A_{LE}/A_{IS}$ ) und der Analytkonzentration bei einem Korrelationskoeffizienten von 0.9989. Die Festphasenextraktion der Enkephalin-Peptide aus den gespikten Plasmaproben erfolgte an RP-18-Kartuschen mit Acetonitril/0.04% Trifluoressigsäure in Wasser (45/55, v/v) als Eluent, wobei Wiederfindungsraten von mehr als 75% erhalten wurden.

Abbildung 29A zeigt beispielhaft ein NACE-ED-Elektropherogramm einer Plasmaprobe, die mit jeweils etwa 4 µM LE und ME und 6.2 µM IS versetzt wurde. Im Vergleich zur NACE-ED zeigt das NACE-UV-Elektropherogramm deutlich mehr Signale der Matrixkomponenten (Abbildung 29B). Dieser Vorteil der erhöhten Selektivität der ED für die Analyse in komplexen Matrices wurde auch für wässrige CE-ED-Applikationen beschrieben [33, 188, 189]. Allerdings ist die vorliegende NACE-ED-Applikation nicht empfindlich genug, um *in vivo* Plasmakonzentrationen der Enkephaline, die im Bereich von 0.02 – 0.15 µM liegen [190, 191], zu bestimmen. Um die Empfindlichkeit dieser Methode weiter zu erhöhen, ist eine weiterführende Optimierung der Probenaufarbeitung (z.B. Größenausschlusschromatographie) und der Einsatz spezieller CE-Injektionsverfahren zur Probenanreicherung (*sample stacking*) nötig.



**Abbildung 29.** Vergleich der (A) NACE-ED- und (B) NACE-UV-Bestimmung einer mit 4.5 µM ME, 4.3 µM LE und 6.2 µM IS gespikten Plasmaprobe nach SPE-Probenaufbereitung. Für experimentelle Details vgl. Manuskript 5.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Peptide mit Hilfe der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese (NACE) analysiert. Es wurden sowohl grundsätzliche, trennmethodische Fragestellungen bearbeitet als auch praktische Anwendungen für die NACE-Analytik von Peptiden entwickelt. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss nichtwässriger Lösungsmittel auf das Dissoziationsverhalten und die Sekundärstruktur von Peptiden untersucht, welche entscheidend das Migrationsverhalten von Peptiden in der CE bestimmen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden zwei Anwendungsbeispiele für den Einsatz der NACE zur Analyse von Peptiden entwickelt, wobei die Kopplung mit der massenspektrometrischen und der elektrochemischen Detektion im Vordergrund stand.

Für die Untersuchungen zum Einfluss nichtwässriger Lösungsmittel auf das Dissoziationsverhalten kleiner Peptide kamen isomere Aspartyl-Dipeptide und Met- und Leu-Enkephalin als Modellsubstanzen zum Einsatz. Es wurden die  $pK_a$ -Werte der Peptide in Methanol, Methanol/Wasser (1:1, v/v) und Wasser unter Verwendung der *apparent pH scale* bestimmt. In Methanol wurde zusätzlich die *conventional pH scale* genutzt, da die damit erhaltenen  $pK_a^*$ -Werte annähernd den thermodynamischen Werten entsprechen. Beim Wechsel von Wasser zu Methanol kommt es sowohl für das Dissoziationsgleichgewicht der Carboxylgruppe ( $pK_{a1}$ ) als auch für das der protonierten Aminogruppe ( $pK_{a2}$ ) zu einer Erhöhung der  $pK_a$ -Werte, was einer Verringerung der Acidität der jeweiligen Gruppe entspricht. Diese  $pK_a$ -Wert-Verschiebung war für die Carboxylgruppe deutlicher ausgeprägt, woraus eine „Kompression“ der Mobilität-pH-Kurve resultierte. Die Möglichkeit einer effizienten Trennung der Peptide in methanolischen Elektrolytsystemen konnte gezeigt werden, wobei auch die Trennung der Diastereomere von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asp-PheOMe gelang. Das analytische Potenzial der NACE konnte anhand der Trennung von Met- und Leu-Enkephalin als Anionen gezeigt werden. Im Gegensatz zur wässrigen CE war in methanolischen Puffern eine Trennung beider Enkephalin-Peptide auch in Puffern mit höheren pH-Werten möglich.

Im zweiten trennmethodischen Teil der Arbeit wurde der Einfluss organischer Lösungsmittel auf das Migrationsverhalten  $\alpha$ -helikaler Polypeptide, bestehend aus 14-31 Aminosäuren, untersucht. Alamethicin F30, verschiedene Ampullosporin A-Derivate, Magainin 2, Cecropin P1 und Mellitin wurden als Modellsubstanzen für diese Untersuchungen genutzt. Diese Peptide wurden in wässrigen und nichtwässrigen CE-Elektrolytsystemen analysiert, wobei ausschließlich eine pH-Optimierung der CE-Puffer durchgeführt wurde. Die Trennung der Polypeptide gelang in allen Fällen besser unter Verwendung der nichtwässrigen Elektrolytsysteme, was mit einer Stabilisierung der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur dieser Peptide beim Wechsel vom wässrigen zum nichtwässrigen Milieu erklärt werden kann. Diese Konformationsänderung konnte mit Hilfe der CD-Spektroskopie nachgewiesen werden. Die CD-Spektren in den nichtwässrigen Elektrolytsystemen zeigten im Vergleich zu den wässrigen CE-Puffern einen signifikant höheren Anteil  $\alpha$ -helikaler Strukturelemente. Um den Effekt der Konformationsänderung auf das Migrationsverhalten zu bestätigen, wurden kleine Oligopeptide, die aus 3-5 Aminosäuren bestehen und keine Lösungsmittel-abhängige Sekundärstruktur ausbilden können, mittels wässriger und nichtwässriger CE untersucht. Im Gegensatz zu den Polypeptiden kam es bei diesen Oligopeptiden zu keiner signifikanten Verbesserung der Trennselektivität bei der

Verwendung verschiedener Lösungsmittel. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Veränderung der Konformation  $\alpha$ -helikaler Polypeptide in nichtwässrigen CE-Puffern einen entscheidenden Einfluss auf die Trennselektivität hat.

Als Anwendungsbeispiele für den Einsatz der NACE zur Peptidanalytik wurden zwei Applikationen entwickelt. In der ersten Anwendung wurden nichtwässrige Elektrolytsysteme zur Charakterisierung des mikroheterogenen Alamethicin F30 (ALM F30) genutzt. Die Identifizierung der Peptide erfolgte dabei mit Hilfe der ESI-MS-Detektion. In der zweiten Applikation konnten die Vorteile der NACE für die elektrochemische Detektion zur Analyse von Enkephalin-Peptiden genutzt werden.

ALM F30, ein aus dem Schimmelpilz *Trichoderma viride* isoliertes Peptaibol-Peptidgemisch mit membranaktiven Eigenschaften, wurde mittels NACE-MS charakterisiert, wobei sowohl ein Ionenfallen- (IT-MS) als auch ein Flugzeit-Massenanalysator (TOF-MS) zum Einsatz kam. Im Vergleich zu wässrigen CE-Puffern zeigten die methanolischen Elektrolytsysteme eine deutlich höhere Trennselektivität, wodurch die Detektion einer größeren Zahl von Nebenkomponten ermöglicht wurde. ESI-IT-MS<sup>n</sup>-Untersuchungen (n = 1-3) dienten zur Identifizierung der Peptide auf der Grundlage des Fragmentierungsmusters ausgewählter Ionen. Die MS<sup>2</sup>-Spektren der Pseudomolekül-Ionen  $[M+2H]^{2+}$  oder  $[M+3H]^{3+}$  zeigen die entsprechenden y- und b-Fragmente, die aus der Spaltung der labilen Aib-Pro-Bindung resultieren. Die MS<sup>3</sup>-Spektren dieser Fragment-Ionen zeigen die b-Acylum-Ionen-Serie und verschiedene interne Fragment-Ionen-Serien. Insgesamt konnten 11 Sequenzen identifiziert werden, die durch einen Ala/Aib-Austausch in Position 6, einen Gln/Glu-Austausch in Position 7 bzw. 19 oder durch einen Verlust des C-terminalen Aminoalkohols charakterisiert sind. Zusätzlich wurden zwei Pyroglutamyl-Rumpfsequenzen identifiziert. Die Migrationsreihenfolge der ALM F30-Peptaibole ist gekennzeichnet durch ein paarweises Auftreten von Peptiden, die mit Ausnahme des Ala/Aib-Austausches in Position 6 identische Sequenzen aufweisen, wobei drei dieser Paare comigrieren. Durch eine geeignete Auswahl der Precursor-Ionen für die MS<sup>n</sup>-Analyse konnten allerdings alle Komponenten eindeutig identifiziert werden. Die schwache elektrophoretische Mobilität von zwei neutralen ALM F30-Komponenten konnte mit Hilfe von Referenzsubstanzen bestätigt werden. Dieses ungewöhnliche Migrationsverhalten neutraler Analyten zeigt die Besonderheiten des Einsatzes nichtwässriger Elektrolytsysteme in der CE und kann mit Ion-Dipol-Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und den Elektrolyt-Ionen erklärt werden, die im nichtwässrigen Milieu stärker ausgeprägt sind.

Im Vergleich zu einer HPLC-MS-Studie wurden insgesamt sieben neue ALM F30 Komponenten gefunden. Der Nachweis der Pyroglutamyl-Peptide soll hierbei besonders hervorgehoben werden, da das Vorkommen von Pyroglutamat als Bestandteil mykotischer Peptide bisher nicht beschrieben wurde.

Die Elementzusammensetzung der identifizierten Peptide konnte mit Hilfe der NACE-ESI-TOF-MS-Analyse bestätigt werden. Der Einsatz eines TOF-Massenanalysators mit einer Massengenauigkeit < 5 ppm erlaubte die Bestimmung der Isotopenverteilung. Ein Vergleich der gemessenen mit den berechneten Isotopenverteilungen zeigte eine Abweichung der Signale für alle identifizierten ALM F30-Komponenten von besser als 2.0 ppm für das  $[M+3H]^{3+}$ -Ion und besser als 5.0 ppm für das

$[M+2H]^{2+}$ -Ion. Der relative Gehalt der ALM F30-Komponenten wurde anhand der NACE-UV- und der NACE-ESI-TOF-MS-Daten berechnet.

Die Neuropeptide Met- und Leu-Enkephalin konnten mit Hilfe der NACE mit elektrochemischer Detektion (NACE-ED) bestimmt werden. Die Trennung dieser Peptide sowohl als protonierte als auch als deprotonierte Spezies gelang in unbehandelten Quarzkapillaren unter Verwendung von auf Methanol und Acetonitril/Methanol-Mischungen basierenden Elektrolytsystemen. Die Verwendung von Polyethylenglycol-beschichteten Kapillaren erlaubte auch die co-elektroosmotische Trennung der deprotonierten Peptide, wobei ein Lithiumacetat-Puffersystem in Acetonitril/Methanol zum Einsatz kam. Dieses Trennsystem eignet sich besonders gut für die elektrochemische Detektion, da neutrale Verunreinigungen der Probe, die eine Inaktivierung der Detektorelektrode verursachen können, erst nach den Analyten mit dem EOF zum Detektor transportiert werden.

Das elektrochemische Verhalten der Enkephalin-Peptide unter hydrodynamischen Bedingungen wurde mit Hilfe der Kapillar-Batch-Injektionsanalyse-Technik (CBIA) untersucht. Die Analyse der Enkephaline mittels NACE-ED im oxidativen Modus gelang nur mit den deprotonierten, negativ geladenen Analyten. Die *counter*-elektroosmotische NACE-ED-Analyse in den unbehandelten Quarzkapillaren unter Verwendung einer Platin-Detektionselektrode mit einem Durchmesser von 60  $\mu\text{m}$  bei einem Detektionspotenzial von +0.65 V ergab eine Bestimmungsgrenze von 0.3  $\mu\text{M}$  für Met- und Leu-Enkephalin. Damit erlaubt die elektrochemische Detektion im Vergleich zur UV-Detektion eine um den Faktor 10 empfindlichere Bestimmung der Enkephalin-Peptide. Eine NACE-ED-Bestimmung der deprotonierten Peptide nach co-elektroosmotischer Trennung in den PEG-Kapillaren war ebenfalls möglich. Die praktische Anwendbarkeit der entwickelten NACE-ED-Methode wurde anhand der Bestimmung von Met- und Leu-Enkephalin in gespikten Plasmaproben nach Festphasenextraktion unter Verwendung von  $[D\text{-Ala}^2]$ -Leu-Enkephalin als internem Standard gezeigt.



## 7 Summary

In the present thesis peptides were analyzed by nonaqueous capillary electrophoresis (NACE). Methodical aspects of peptide separations in NACE were investigated and practical applications for the analysis of peptides were developed. In the first part of the thesis the influence of nonaqueous solvents on the dissociation behavior and the secondary structure of peptides was investigated, two important parameters which influence peptide migration. In the second part two NACE applications for peptide analysis with mass spectrometry detection and electrochemical detection were developed.

Isomeric aspartyl dipeptides and Leu- and Met-enkephalin served as model compounds to study the influence of organic solvents on the dissociation behavior of small peptides.  $pK_a$ -values were determined in methanol, water/methanol (1:1, v/v) and water based on the apparent pH scale. In the case of methanol the conventional pH scale was also used because the deviation of the resulting  $pK_a^*$ -values from the thermodynamic values are much smaller. Changing from water to methanol led to an increase of the ionization constants describing the dissociation equilibria of the carboxyl group ( $pK_{a1}$ ) and the amino group ( $pK_{a2}$ ), respectively. This can be translated into a decrease of the acidity of the respective groups. The  $pK_a$  shift was more pronounced for the carboxylic acid function leading to a compression of the mobility-pH curve. Efficient separations of the peptides were achieved in methanolic electrolyte solutions including the resolution of the diastereomers of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Asp-PheOMe. The analytical power of NACE is demonstrated by the separation of the structurally closely related neuropeptides Leu-enkephalin and Met-enkephalin. In contrast to aqueous buffers, the separation of these peptides could also be obtained in alkaline buffers in methanol.

In the second methodical part the influence of organic solvents on the migration behavior of  $\alpha$ -helical polypeptides consisting of 14-31 amino acid residues was investigated. Alamethicin F30, magainin 2, cecropin P1 and ampullosporin A analogs served as model compounds. The peptides were analyzed using aqueous and nonaqueous electrolyte systems, while the buffers were optimized with respect to the pH only. Generally, higher separation selectivities for the polypeptides were observed in nonaqueous electrolytes, which can be explained by a stabilization of the  $\alpha$ -helical secondary structure of the peptides changing from the aqueous to a nonaqueous system. The conformational changes were analyzed by CD spectroscopy. CD spectra revealed a significant increase in helical structure in nonaqueous electrolytes compared to aqueous buffers. In order to confirm the effect of the conformational changes on the migration behavior small oligopeptides of 3-5 amino acid residues, which are not able to adopt a different secondary structure in an organic solvent, were analyzed by aqueous and nonaqueous CE. In contrast to the polypeptides, no significant effect on the separation selectivity was obtained using different solvents. Thus, the change in secondary structure of the polypeptides contributed primarily to the different separation selectivity observed in aqueous and nonaqueous CE.

The practical application of NACE for the analysis of peptides was demonstrated by two methods. In the first application nonaqueous electrolyte systems were used for the characterization of a microheterogeneous mixture of alamethicin F30 (ALM F30). The identification of the peptides was

elucidated by ESI-MS detection. In the second application the benefits of nonaqueous solvents for CE with electrochemical detection were applied to the analysis of enkephalin peptides.

ALM F30, a mixture of membrane active peptaibol peptides isolated from the fermentation broth of *Trichoderma viride* was analyzed by NACE coupled to electrospray ion trap mass spectrometry (ESI-IT-MS) and electrospray time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS). Compared to aqueous buffers higher separation selectivity was observed for methanolic background electrolytes allowing the detection of more minor components. ESI-IT-MS<sup>n</sup> (n = 1-3) was used for elucidation of the amino acid sequence based on the fragmentation pattern of selected parent ions. The MS<sup>2</sup> spectra using the [M+2H]<sup>2+</sup> or [M+3H]<sup>3+</sup> ions as precursor ions displayed the respective b- and the y-type fragments resulting from cleavage of the particularly labile Aib-Pro bond. The MS<sup>3</sup> of these fragments generated the b acylium ion series, as well as internal fragment ion series. Eleven amino acid sequences were identified, characterized by the exchange of Ala to Aib in position 6, Gln to Glu in positions 7 or 19 as well as the loss of the C-terminal amino alcohol. In addition, two truncated pyroglutamyl peptaibols were found. In most cases comigration of Aib peptaibols with the respective Ala component was observed because the mass difference of m/z 14 as the result of the amino acid exchange was not sufficient to translate into an electrophoretic separation under the conditions applied. However, proper selection of the precursor ions allowed the unequivocal analysis of the components. The low electrophoretic mobility observed for neutral analytes under nonaqueous conditions was confirmed by the NACE analysis of reference substances. This unusual migration behavior of neutral substances can be explained by ion-dipole interactions between the peptide analytes and electrolyte ions which are stronger in nonaqueous solvents.

Overall, seven new sequences are reported compared to earlier LC-MS studies. Pyroglutamyl peptides have been identified from a fungal source for the first time.

The elemental composition of the ALM F30 components was confirmed by NACE-ESI-TOF-MS analysis. The TOF mass analyzer with a mass accuracy better than 5 ppm allowed the determination of the isotope pattern. The comparison between measured and calculated isotope patterns showed a deviation of the signals for all ALM F30 components clearly better than 2 ppm for the [M+3H]<sup>3+</sup>-ions and better than 5 ppm for the [M+2H]<sup>2+</sup>-ions. The relative amount of the individual components was achieved by a combination of UV and TOF-MS detection.

The neuropeptides Met- and Leu-enkephalin were investigated by nonaqueous capillary electrophoresis with electrochemical detection (NACE-ED). The separation of the peptides as protonated and deprotonated species was obtained in bare fused silica capillaries using methanol and acetonitrile/methanol mixture based electrolyte systems. The use of PEG-coated capillaries also allowed the coelectroosmotic separation of the deprotonated peptides using a lithium acetate/acetic acid buffer in acetonitrile/methanol. The latter conditions appear especially favorable for electrochemical detection as the compounds migrated before the EOF, therefore, avoiding any influence of neutral analytes on the sensing electrode.

The electrochemical behavior of the enkephalins was studied by the capillary batch injection analysis technique (CBIA). NACE-ED yielded well defined signals in the oxidation mode only for the negatively charged analytes. The counterelectroosmotic NACE-ED analysis using bare fused silica capillaries

and a 60  $\mu\text{m}$  platinum detection electrode set to an detection potential of +0.65 V resulted in a detection limit of 0.3  $\mu\text{M}$  for Met- and Leu-enkephalin, respectively. The detection limits are about one order of magnitude better compared to UV detection. Electrochemical detection of the enkephalins in the deprotonated form in the coelectroosmotic mode can also be performed in PEG-coated capillaries. For the quantification of the enkephalins [D-Ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalin was used as internal standard. The practical utility for the determination of enkephalins in spiked plasma samples after solid phase extraction was demonstrated.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Sewald, N., Jakubke, H.-D., *Peptides: Chemistry and Biology*, Viley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, 61-126.
- [2] Walsh, G., *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 865-870.
- [3] Washburn, M. P., Wolters, D. A., Yates, J. R., *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 242-247.
- [4] Wolters, D. A., Washburn, M. P., Yates, J. R., *Anal. Chem.* 2001, 73, 5683-5690.
- [5] Hayek, M., *J. Phys. Colloid Chem.* 1951, 55, 1527-1533.
- [6] Waldbroehl, Y., Jorgenson, J. W., *J. Chromatogr.* 1984, 315, 135-143.
- [7] Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 2002, 23, 3865-3883.
- [8] Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Electrophoresis* 2002, 23, 1887-1899.
- [9] Cottet, H., Vayaboury, W., Kirby, D., Giani, O., Taillades, J., Schué, F., *Anal. Chem.* 2003, 75, 5554-5560.
- [10] Yang, Q., Benson, L. M., Johnson, K. L., Naylor, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 103-121.
- [11] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298-1302.
- [12] Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, Europarat, Straßburg, Frankreich, 2005.
- [13] United States Pharmacopeia 26, USP Convention Inc., Rockville, USA, 2003.
- [14] Bockris, J. O'M, Reddy, A. K. N., *Modern Electrochemistry 1: Ionics*, Plenum Press, New York 1998.
- [15] Schomburg, G., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1998, S. 481-523.
- [16] Righetti, P. G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L., *Electrophoresis* 2001, 22, 603-611.
- [17] Horvath, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644-655.
- [18] Patrick, J. S., Lagu, A. L., *Electrophoresis* 2002, 22, 4179-4196.
- [19] Smith, R. D. (Ed.), *Electrophoresis* 2002, 23, 3095-3252.
- [20] Kunkel, A., Wätzig, H., *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 1999, 332, 175-178.
- [21] Towns, J. K., Regenier, F. E., *Anal. Chem.* 1992, 64, 2473-2478.
- [22] Wang, T., Hartwig, R. A., *J. Chromatogr.* 1992, 607, 119-125.
- [23] Waterval, J. C. M., Lingeman, H., Bult, A., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 4029-4045.
- [24] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 1999, 20, 3134-3144.
- [25] Prata, C., Bonnafous, P., Fraysse, M., Poinot, V., Couderc, F., *Electrophoresis* 2001, 22, 4129-4138.
- [26] Padaruskas, A., *Electrophoresis* 2003, 24, 2054-2063.
- [27] Heiger, D. N., Kaltenbach, P., Sievert, H.-J. P., *Electrophoresis* 1994, 15, 1234-1247.
- [28] Altria, K. D., *LC-GC International* 1999, 1, 24-29.
- [29] Landers, J. P., (Ed.), *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC Press, New York 1997.
- [30] Lacroix, M., Poinot, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2005, 26, 2608-2621.
- [31] Venter, J. C., et al., *Science* 2001, 291, 1304-1351.
- [32] Kuhr, W. G., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1832-1834.
- [33] Baldwin, R. P., *Electrophoresis* 2000, 21, 4017-4028.

- [34] LaCourse, W. R., in Wilson, I., Poole, C., Cooke, M. (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, New York 2000, S. 670-676.
- [35] Matysik, F.-M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 375, 33-35.
- [36] Blasco, S., Gläser, P., Matysik, F.-M., *Electroanal.* 2005, 17, 1187-1191.
- [37] Wang, J., *Electroanal.* 2005, 17, 1133-1140.
- [38] Ewing, A. G., Mesaros, J. M., Gavin, P. F., *Anal. Chem.* 1994, 66, 527A-537A.
- [39] Swanek, F. D., Chen, G., Ewing, A. G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 3912-3916.
- [40] Hu, S., Pang, D., Wang, Z., Cheng, J., Li, Z., Fan, Y., Hu, H., *Chem. J. Chin. Univ.* 1996, 17, 1207-1209.
- [41] Dong, Q., Jin, W., *Electrophoresis* 2001, 22, 2786-2792.
- [42] Jin, W., Li, X., Gao, N., *Anal. Chem.* 2003, 75, 3859-3864.
- [43] Jin, W., Li, W., Xu, Q., *Electrophoresis* 2000, 21, 774-779.
- [44] Holland, L., Leigh, A. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3649-3658.
- [45] Matysik, F.-M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 2581-2586.
- [46] Zemmann, A. J., *Electrophoresis* 2003, 24, 2125-2137.
- [47] Guijt, R. M., Evenhuis, C. J., Macka, M., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2004, 25, 4032-4057.
- [48] Haber, C., Jones, W. R., Soglia, J., Surve, M. A., McGlynn, M., Caplan, A., Reineck, J. R., Krstanovic, C., *J. Cap. Electrophor.* 1996, 3, 1-11.
- [49] <http://www.istech.at>
- [50] von Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., *Electrophoresis* 2001, 22, 1251-1266.
- [51] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3737-3867.
- [52] Hernández-Borges, J., Neusüß, C., Cifuentes, A., Pelzing, M., *Electrophoresis* 2004, 25, 2257-2281.
- [53] Dole, M., Mack, L. L., Hines R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice M. B., *J. Chem. Phys.* 1968, 49, 2240-2249.
- [54] Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R., Smith, R. D., *Anal. Chem.* 1987, 59, 1230-1232.
- [55] Lee, E. D., Mück, W., Henion, J. D., Covey, T. R., *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* 1989, 18, 844-850.
- [56] Wahl, J. H., Smith, R. D., *J. Capillary Electrophor.* 1994, 1, 62-71.
- [57] Muijselaar, P. G., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 3-15.
- [58] Nilsson, S. L., Andersson, C., Sjöberg, P. J. R., Bylund, D., Petersson, P., Jörntén-Karlsson, M., Markides, K. E., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 2267-2272.
- [59] Boyle, J. G., Whitehouse, C. M., *Anal. Chem.* 1992, 64, 2084-2089.
- [60] Henry, C. M., *Anal. Chem.* 1999, 197A-201A.
- [61] Tomer, K. B., *Chem. Rev.* 2001, 101, 297-328.
- [62] Kašička, V., *Electrophoresis* 1999, 20, 3084-3105.
- [63] Kašička, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 4139-4162.
- [64] Kašička, V., *Electrophoresis* 2003, 24, 4013-4046.
- [65] Offord, R. E., *Nature* 1966, 211, 591-593.
- [66] Adamson, N. J., Reynolds, E. C., *J. Chromatogr. B* 1997, 699, 133-147.
- [67] Kim, J., Zand, R., Lubman, D. M., *Electrophoresis* 2003, 24, 782-793.
- [68] Sitaram, B. R., Keah, H. H., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 1999, 857, 263-273.

- [69] Cross, R. F., Granham, N. F., *Chromatographia* 2001, 54, 639-646.
- [70] Cross, R. F., Wong, M. G., *Chromatographia* 2001, 53, 431-436.
- [71] Rodriguez, I., Li, S. F. Y., *Anal. Chim. Acta* 1999, 383, 1-26.
- [72] Stroink, T., Paarlberg, E., Waterval, J. C. M., Bult, A., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2001, 22, 2375-2383.
- [73] Neusüß, C., Pelzing, M., Macht, M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3149-3159.
- [74] Roepstorff, P., Fohlmann, J., *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, 11, 601.
- [75] Guijt, R. M., Baltussen, E., van der Stehen, G., Frank, H., Billiet, H., Schalkhammer, T., Laugere, F., Vellekoop, M., Berthold, A., Sarro, L., van Dedern G. W. K., *Electrophoresis* 2001, 22, 2537-2541.
- [76] Tanyanyiwa, J., Leuthardt, S., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2002, 23, 3659-3666.
- [77] Baldwin, R. P., *Electrophoresis* 2000, 21, 4017-4028.
- [78] Zhou, J., Lunte, S. M., *Anal. Chem.* 1995, 67, 13-18.
- [79] O'Shea, T. J., Lunte, S. M., *Anal. Chem.* 1993, 65, 247-250.
- [80] Jin, W., Dong, Q., Ye, X., Yu, D., *Anal. Biochem.* 2000, 285, 255-259.
- [81] Wang, W., Xin, H., Shao, H., Jin, W., *J. Chromatogr. B* 2003, 789, 425-429.
- [82] Voegel, P. D., Baldwin, R. P., *Am. Lab.* 1996, 28, 39-45.
- [83] Ye, J., Baldwin, R. P., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2669-2674.
- [84] Gawron, A., Lunte, S., *Electrophoresis* 2000, 21, 3205-3211.
- [85] Lacher, N., Garrison, K. E., Lunte, S. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 1577-1584.
- [86] Wang, J., Chen, G., Pumera, M., *Electroanal.* 2003, 15, 862-865.
- [87] Rose, M. J., Lunte, S. M., Carlson, R. G., Stobaugh, J. F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1851-1859.
- [88] Righetti, P. G., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1998, S. 973-998.
- [89] Righetti, P. G., Verzola, B., *Electrophoresis* 2001, 22, 2359-2374.
- [90] Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 2001, 437, 309-321.
- [91] Poole, S., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C. F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 445-454.
- [92] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 4333-4340.
- [93] Sahota, R. S., Khaledi, M. G., *Anal. Chem.* 1994, 66, 1141-1146.
- [94] Porras, S. P., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2005, 26, 3203-3220.
- [95] Bowser, M. T., Kranack A. R., Chen D. D. Y., *Trends Anal. Chem.* 1998, 17, 424-434.
- [96] Steiner, F., Hassel, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1068, 131-142.
- [97] Matysik, F.-M., *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 349-354.
- [98] Marcus, Y., *The Properties of Solvents*, Wiley Series in Solution Chemistry, Vol. 4, Wiley, Chichester 1998.
- [99] Grob, M., Steiner, F., *Electrophoresis* 2002, 23, 1853-1861.
- [100] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1485-1498.
- [101] Porras, S. P., Riekkola, M.-L., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A*, 2001, 905, 259-268.

- [102] Porras, S. P., Kuldvee, R., Jussila, M., Palonen S., Riekkola, M.-L., *J. Separation Sci.* 2003, 26, 857-862.
- [103] Miller, J. L., Khaledi, M. G., Shea, D., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1223-1229.
- [104] Kortüm, G., Vogel, W., Andrussov, K., *Dissociation constants of organic acids in aqueous solution*, Butterworths, London 1961.
- [105] Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
- [106] Gübitz, G., Schmid, M. G., *Electrophoresis* 2004, 23, 3981-3996.
- [107] Chankvetadze, B., Blaschke, G., *Electrophoresis* 2000, 21, 4159-4178.
- [108] Lämmerhofer, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1068, 3-30.
- [109] Lämmerhofer, M., Zarbl, E., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 509-521.
- [110] Porras, S. P., Jussila, M., Sinervo, K., Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* 1999, 20, 2510-2518.
- [111] Ward, V. L., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. B* 1998, 718, 15-22.
- [112] Matysik, F.-M., *Electrophoresis* 2002, 23, 400-407.
- [113] Backofen, U., Matysik, F.-M., Lunte, C. E., *J. Chromatogr. A* 2002, 942, 259-269.
- [114] Matysik, F.-M., *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 27-34.
- [115] Guo, L., Matysik, F.-M., Gläser, P., Engewald, W., *Electrophoresis* 2005, 26, 3341-3348.
- [116] Backofen, U., Matysik, F.-M., Hoffmann, W., Lunte, C. E., *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 367, 359-363.
- [117] Steiner, F., Hassel, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3994-4016.
- [118] Šafařík, L., Stránský, Z., *Titrimetric analysis in organic solvents*, Elsevier, Amsterdam 1986, S. 51-109.
- [119] Sarmini, K., Kenndler, E., *J. Biochem. Biophys. Methods* 1999, 38, 123-137.
- [120] Barbosa, J., Marqués, I., Barrón, D., Sanz-Nebot, V., *TRAC-Trends Anal. Chem.* 1999, 18, 543-549.
- [121] Rondini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., *Pure Appl. Chem.* 1987, 59, 1549-1560.
- [122] Walden, P., Birr, E. J., *Z. Phys. Chem.* 1931, 153, 1-51.
- [123] Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 2001, 437, 309-321.
- [124] Chariot, G., Trémillon, B., *Chemical Reactions in Solvents and Melts*, Pergamon Press, Oxford 1969, S. 278-279.
- [125] Izmailov, N. A., Mozharova, T. V., *Zh. Fiz. Khim.* 1960, 34, 1709-1715.
- [126] Goldschmidt, H., Mathiesen, E., *Z. Phys. Chem.* 1926, 119, 439-473.
- [127] Porras, S. P., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 455-465.
- [128] Hirota, N., Mizuno, K., Goto, Y., *J. Mol. Biol.* 1998, 275, 365-378.
- [129] Castagnola, M., Cassiano, L., Messina, I., Paci, M., Rossetti, D. V., Giardina, B., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 271-281.
- [130] Whitmore, L., Chugh J. K., Snook, C. F., Wallace, B. A., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 663-665.
- [131] Shai, Y., *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1462, 55-77.
- [132] Epand, R. M., Vogel, H. J., *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1462, 11-28.
- [133] Bechinger, B., *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1462, 157-183.

- [134] Rodger, A., Nordén, B., *Circular dichroism and linear dichroism*, Oxford University Press, Oxford 1997, S. 15-31.
- [135] Muzikar, J., van de Goor, T., Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 375-382.
- [136] Okada, T., *J. Chromatogr. A* 1997, 771, 275-284.
- [137] Kubicek, C. P., Harman, G. E., *Trichoderma and Gliocladium, Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics*, Verlag Taylor and Francis, London 1998.
- [138] Kleinkauf, H., von Döhren, H., *Ann. Rev. Microbiol.* 1987, 41, 259-289.
- [139] Kleinkauf, H., von Döhren, H., *Eur. J. Biochem.* 1990, 192, 1-15.
- [140] Brückner, H., Przybylski, M., *J. Chromatogr.* 1984, 296, 263-275.
- [141] Rebuffat, S., Goulard, C., Bodo, B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1995, 1849-1855.
- [142] Okuda, M., Lida, A., Uesato, S., Nagaoka, Y., Fujita, T., Takaishi, Y., Terada, H., *Biol. Pharm. Bull.* 1994, 17, 482-485.
- [143] Oh, S. U., Yun, B. S., Lee, S. J., Kim, J. H., Yoo, I. D., *J. Antibiot.* 2002, 55, 557-564.
- [144] Ritzau, M., Heinze, S., Dornberger, K. J., Berg, A., Fleck, W., Schlegel, B., Härtl, A., Gräfe, U., *J. Antibiot.* 1997, 50, 722-728.
- [145] Kronen, M., *Untersuchungen über Struktur und Wirkungsweise natürlich vorkommender und partialsynthetischer Ampullosporine*, Dissertationsarbeit, Jena 2003.
- [146] Boheim, G., Hanke, W., Jung, G., *Biophys. Struct. Mechan.* 1983, 9, 181-191.
- [147] Grigoriev, P. A., Berg, A., Schlegel, R., Gräfe, U., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1997, 44, 155-158.
- [148] Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., Gräfe, U., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 666-678.
- [149] Jaworski, A., Brückner, H., *J. Peptide Sci.* 2001, 7, 433-447.
- [150] Jaworski, A., Brückner, H., *J. Chromatogr. A* 1999, 862, 179-189.
- [151] Jaworski, A., Brückner, H., *J. Peptide Sci.* 2000, 6, 149-167.
- [152] Kirschbaum, J., Krause, C., Winzheimer, R. K., Brückner, H., *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 799-809.
- [153] Meyer, C. E., Reusser, F., *Experienta* 1967, 23, 85-86.
- [154] Payne, J. W., Jakes, R., Hartley, B. S., *Biochem. J.* 1970, 117, 757-766.
- [155] Martin, D. R., Williams, R. J. P., *Biochem. J.* 1976, 153, 181-190.
- [156] Jung, G., Dubischar, N., Leibfritz, D., *Eur. J. Biochem.* 1975, 54, 395-409.
- [157] Pandey, R. C., Cook, C. J., Rinehart, K. L., *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 8469-8483.
- [158] Schmitt, H., Jung, G., *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 321-344.
- [159] Izutsu, K., *Electrochemistry in nonaqueous solution*, Wiley VCH, Weinheim 2002, S. 59-83.
- [160] Berg, A., Grigoriev, P. A., Degenkolb, T., Neuhofer, T., Härtl, A., Schlegel, B., Gräfe, U., *J. Pept. Sci.* 2003, 9, 810-816.
- [161] Spengler, B., Lützenkirchen, F., Metzger, S., Chaurand, P., Kaufmann, R., Jeffery, W., Bartlett-Jones, M., Pappin, D. J. C., *Intern. J. Mass. Spec. Ion Proc.* 1997, 169-170, 127-140.
- [162] Brückner, H., Kripp, M., Kieß, M., *Chemistry of Peptides and Proteins* 1993, 5/6, 357-373.
- [163] Schiell, M., Hofmann, J., Kurz, M., Schmidt, F. R., Vertesy, L., Vogel, M., Wink J., Seibert, G., *J. Antibiotics* 2001, 54, 220-233.
- [164] Huang, R.-H., Xiang, Y., Liu, X.-Z., Zhang, Y., Hu, Z., Wang, D.-C., *FEBS Lett.* 2002, 521, 87-90.



- [165] Köllisch, G. V., Lorenz, M. W., Kellner, R., Verhaert, P. D., Hoffmann, K. H., *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 5502-5508.
- [166] Silva, P. I., Daffre, S., Bulet, P., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 33464-33470.
- [167] Garden, R. W., Moroz, T. P., Gleeson, J. M., Floyd, P. D., Li, L., Rubakhin, S. S., Sweedler, J., *J. Neurochem.* 1999, 72, 676-681.
- [168] Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A. V., Rodriguez, J., Bachère, E., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 28398-28406.
- [169] Desrues, L., Tonon, M.-C., Leprince, J., Vaudry, H., Conlon, J. M., *Endocrinology* 1998, 139, 4140-4146.
- [170] Ianzer, D., Konno, K., Marques-Porto, R., Portaro, F. C. V., Stöcklin, R., de Camargo, A. C. M., Pimenta, D. C., *Peptides* 2004, 25, 1085-1092.
- [171] Messer, M., *Nature* 1963, 197, 1299.
- [172] Olson, G. A., Olson, R., D., Kastin, A. J., *Peptides* 1993, 14, 1339-1378.
- [173] Zhu, X., Desiderio, D., *Mass Spectrom. Rev.* 1996, 15, 213-240.
- [174] Silberring, J., Ekman, R., *Mass spectrometry and hyphenated techniques in neuropeptide research*, Wiley-Interscience, New York 2002, S. 467-482.
- [175] Lee, H. G., Tseng, J. L., Becklin, R. R., Desiderio D. M., *Anal. Biochem.* 1995, 229, 188-197.
- [176] Lee, H. G., Desiderio D. M., *Anal. Chim. Acta* 1999, 383, 79-99.
- [177] Jäverfalk-Hoyes, E. M., Bondesson, U., Westerlund, D., Andrén, P. E., *Electrophoresis* 1999, 20, 1527-1532.
- [178] Dawson, R., Steves, J. P., Lorden, J. L., Oparil, S., *Peptides* 1985, 6, 1173-1178.
- [179] Fleming, L. H., Reynolds, N. C., *J. Chromatogr.* 1988, 431, 65-76.
- [180] Šolínová, V., Kašička, V., Barth, T., Hauzerová, L., Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 9-18.
- [181] Belder, D., Husmann, H., Warnke, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 666-672.
- [182] Belder, D., Warnke, J., *Langmuir* 2001, 17, 4962-4966.
- [183] Banka, P. A., Selser, J. C., Wang, B., Shenoy, D. K., Martin, R., *Macromolecules* 1996, 29, 3956-3959.
- [184] Okada, T., *J. Chromatogr. A* 1999, 834, 73-87.
- [185] Belder, D., Elke, K., Husmann, H., *J. Microcol. Sep.* 1999, 11, 209-213.
- [186] Backofen, U., Matysik, F.-M., Hoffmann, W., Ache, H.-J., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 362, 189-193.
- [187] Sahlin, E., Beisler, A. T., Weber, S. G., Sandberg, M., in: Brajter-Toth, A., Chambers, J. Q. (Eds.), *Electroanalytical Methods for Biological Materials*, Marcel Dekker, Inc., New York 2002, S. 367-398.
- [188] Holland, L. A., Leigh, A. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3649-3658.
- [189] Voegel, P. D., Baldwin, R. P., *Electrophoresis* 1997, 18, 2267-2278.
- [190] Fleming, L. H., Reynolds, N. C., *J. Chromatogr.* 1988, 431, 65-76.
- [191] Smith, T. W., Hughes, J., Kosterlitz, H. W., Sosa, R. P., in: Kosterlitz, H. W. (Ed.), *Opiates and endogenous opioid peptides*, Elsevier Press, Amsterdam 1976, S. 57-62.

## Weitere Veröffentlichungen

### Weitere Publikation

Separation of peptides by capillary electrophoresis

G. K. E. Scriba, A. Psurek, in: P. Schmitt-Kopplin, Herausg. Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, accepted 2004.

### Tagungsbeiträge

1. A. Psurek, G. K. E. Scriba, Separation of peptides by nonaqueous capillary electrophoresis. *15<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separations and Analysis – HPCE*, 13.-18. April 2002, Stockholm, Schweden.
2. G. K. E. Scriba, S. De Boni, A. Psurek, F. Süß. Peptid-Stereoisomerentrennungen mit der Kapillarelektrophorese. *DPHG Fachgruppentagung Arzneimittelkontrolle/Pharmazeutische Analytik*, 9. Oktober 2002, Berlin.
3. A. Psurek, G. K. E. Scriba, Separation of peptides by nonaqueous capillary electrophoresis: Determination of dissociation constants by capillary electrophoresis - Comparison of methanol and aqueous buffers. *DPHG Jahrestagung*, 9.-12. Oktober 2002, Berlin.
4. A. Psurek, F.-M., Matysik, G. K. E. Scriba, Analysis of enkephalin peptides by nonaqueous capillary electrophoresis and electrochemical detection. *DPHG Jahrestagung*, 08.-11. Oktober 2003, Würzburg.
5. A. Psurek, Investigation of the dissociation behaviour in methanol compared to water, determination of enkephalin neuropeptides using NACE with electrochemical detection. *Annual Seminar of the Institute of Analytical Chemistry/University of Leipzig*, 16.-17. Januar 2004, Großbothen.
6. A. Psurek, F.-M. Matysik, G. K. E. Scriba, The potential of nonaqueous solvents in capillary electrophoresis. *17<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis - HPCE*, 8.-12. Februar 2004, Salzburg, Österreich.
7. A. Psurek, G. K. E. Scriba, Application of nonaqueous capillary electrophoresis to the separation of lipophilic peptides. *DPHG Jahrestagung*, 6.-9. Oktober 2004, Regensburg.
8. A. Psurek, Nonaqueous Capillary Electrophoresis of Peptides - Separation of pore-forming helical peptides and determination of enkephalin peptides by NACE-ED, *Annual Seminar of the Institute of Analytical Chemistry/University of Leipzig*, 14.-15. Januar 2004, Dreiskau-Muckern.

9. A. Psurek, C. Neusüß, H. Brückner, G. K. E. Scriba, Analysis of alamethicin F30 by nonaqueous capillary electrophoresis mass spectrometry. *DPHG Jahrestagung*, 5.-8. Oktober 2005, Mainz.
10. A. Psurek, C. Neusüß, M. Pelzing, G. K. E. Scriba, Analysis of the antimicrobial peptaibol alamethicin F30 by nonaqueous capillary electrophoresis mass spectrometry. *AAPS Annual Meeting*, 6.-10. November 2005, Nashville, Tennessee USA.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Arndt Psurek  
Geburtsdatum, -ort: 31. März 1976, Gera  
Adresse: Fröbelstieg 8, 07743 Jena  
Familienstand: unverheiratet, 2 Kinder

### Schulbildung

09/1982 – 08/1990 Polytechnische Oberschule in Gera  
09/1990 – 06/1994 Karl-Theodor-Liebe Gymnasium, Gera  
06/1994 Allgemeine Hochschulreife/Abitur

### Ersatzdienst

07/1994 – 09/1995 Mitarbeiter, DRK Blutspendedienst Thüringen, Gera  
Bereich: Produktion, plasmaverarbeitende Abteilung

### Studium

10/1995 – 10/1999 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
01/2001 Abschluss: Approbation als Apotheker

### Promotion

seit 01/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für  
Pharmazeutische/Medizinische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität  
Jena, Arbeitsgruppe: Prof. Scriba  
Promotionsthema: „Nichtwässrige Kapillarelektrophorese zur Analytik  
von Peptiden“

### Praktika

06/2000 – 11/2000 Pharmaziepraktikant, Apotheke am Nollendorfer Hof, Jena  
11/1999 – 05/2000 Pharmaziepraktikant, Novartis Pharma GmbH, Wehr/Baden  
Bereich: Pharma Technik Qualitätssicherung  
07/1996 – 08/1996 Famulatur im Rahmen des Pharmaziestudiums, Kranken-  
hausapotheke des Klinikums der Stadt Gera

Jena, 01. November 2005

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt und bisher keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit vorgelegt wurde.

Jena, 01. November 2005

Arndt Psurek